



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA**  
**Escola Superior Agrária**



**Mestrado em Engenharia Alimentar**

**Influência da diversidade genética da flor de cardo nas propriedades  
físico-químicas do queijo de Évora**

**Vanessa Cristina Regalo da Silva**

**Beja**

**2019**

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA**

**Escola Superior Agrária**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

**Influência da diversidade genética da flor de cardo nas  
propriedades físico-químicas do queijo de Évora**

**Dissertação apresentada na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de  
Beja**

**Elaborado por:**

**Vanessa Cristina Regalo da Silva**

**Orientador:**

**Professor Doutor Nuno Bartolomeu Alvarenga**

**Co-Orientador:**

**Professor Doutor João Jorge Mestre Dias**

**Beja**

**2019**

*Dedico a minha tese à minha mãe*

## Agradecimentos

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram ao longo desta caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Nuno Bartolomeu Alvarenga, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade, ensinamento e orientação prestada, pelo apoio incondicional e compreensão que sempre manifestou.

Ao Professor João Dias, co-orientador da minha tese, pela orientação prestada e pelo conhecimento transmitido ao longo do curso e da dissertação. Pela simpatia e boa disposição que sempre transmitiu.

À Engenheira Patrícia Coelho por todo o seu apoio, motivação, pelo companheirismo e por toda a amizade manifestada durante a realização desta dissertação. O meu muito obrigado.

À Professora Doutora Silvina Ferro Palma, agradeço pelo apoio incondicional, disponibilidade e pelo conhecimento transmitido ao longo do curso de Mestrado.

À Professora Maria João Carvalho pela sabedoria transmitida ao longo do mestrado e pela simpatia me transmitiu todos os dias.

À Engenheira Manuela, Maria Diogo e Fernanda Matias por todo o apoio e atenção prestada.

Ao CEBAL por me fazer sentir integrada no projeto ValBioTecCynara e por esta oportunidade.

Aos meus colegas de Mestrado e Professores que me receberam e acompanharam, nesta aventura, fazendo-me sentir sempre em casa.

À minha mãe que nunca desistiu do meu sonho, que o tornou possível e pelo amor incondicional. Agradeço a Deus, todos os dias, pela mãe que tenho.

**A todos, O meu Eterno Obrigado.**

Trabalho desenvolvido no âmbito do projeto ALT20-03-0145-FEDER-000038, designado por “ValBioTecCynara - Valorização económica do cardo (*Cynara cardunculus*): variabilidade natural e assuas aplicações biotecnológicas”, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Alentejo (ALENTEJO2020), com participação financeira FEDER.



**Co-Financiamento:**



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional

## Resumo

Muitas queijarias tradicionais utilizam a flor de cardo, *Cynara cardunculus* L., como coagulante, suscitando um grande interesse na investigação das propriedades coagulantes da flor desta planta e dos seus potenciais, visando a valorização da sua espécie.

Esta dissertação, integrada no projeto ValBioTecCynara, teve como objetivo principal estudar a influência de 3 populações de *Cynara cardunculus* L. nas propriedades físico-químicas do queijo de Évora, ao longo da maturação. Foram produzidas amostras de queijo, de acordo com as especificações de queijo de Évora DOP, com quatro agentes coagulantes diferentes: três populações de *Cynara cardunculus* L. (C1, C2 e C3) e um de origem animal (A). A monitorização das propriedades físicas e químicas de amostras de queijo elaboradas com estes 4 agentes coagulantes foi realizada aos 1, 3, 7, 14, 21, 35, 49, 60 e 90 dias (d) de cura.

A evolução das propriedades físico-químicas durante a maturação permitiu observar que este tipo de queijos apresenta, no final da cura, valores muito baixos de humidade, inferiores a 20% ao contrário dos valores iniciais que são cerca de 60%. Esta desidratação excessiva das amostras promoveu um endurecimento que se refletiu ao nível do incremento dos resultados de dureza. A partir das correlações de Pearson, concluiu-se que a perda de peso é o evento que tem mais importância na estrutura deste queijo. Por outro lado, a análise em componentes principais permitiu concluir que, no início da cura, as propriedades físico-químicas reológicas foram influenciadas pelo agente coagulante mas, à medida que a dinâmica de cura foi avançando, outros agentes poderão ter tido mais preponderância nestas propriedades como as enzimas produzidas pelos microrganismos responsáveis pela cura.

**Palavras-chave** *Cynara cardunculus*; propriedades físico-químicas; maturação; queijo de Évora;

## Abstract

Many traditional dairies use *Cynara cardunculus* L. as a vegetable coagulant, provoking a great interest in the research of this flower and its potentials, aiming the valorization of this species.

This work, integrated in the ValBioTecCynara project, had as main objective the study of the influence of three populations (or ecotypes) of *Cynara cardunculus* L. on the physicochemical properties of Évora cheese, throughout the maturation. Cheese samples were produced according to the Évora PDO cheese specifications, with four different coagulant agents: three populations of *Cynara cardunculus* L. (C1, C2 and C3) and one of animal rennet (A). Monitoring of the physical and chemical properties of cheese samples prepared with these 4 coagulating agents was performed at 1, 3, 7, 14, 21, 35, 49, 60 and 90 days (d) of cure.

The evolution of the physicochemical properties during maturation showed that at the end of the curing, these cheeses had very low values of humidity, less than 20% contrary to the initial values that about 60%. This excessive dehydration of the samples promoted a hardening that was reflected in the increase of the hardness results. Through the Pearson's correlations, it was concluded that weight loss is the most important event in the structure of this cheese. On the other hand, the analysis in main components allowed to conclude that, at the beginning of the ripening, the physicochemical and rheological properties were influenced by the coagulant agent, but as the ripening proceeds, other agents will have more preponderance in these properties like the enzymes produced by the microorganisms responsible for the ripening process.

**Keywords:** *Cynara cardunculus* L; physicochemical properties; maturation; Évora cheese;





# Índice geral

Índice geral.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabela .....	ix
Capítulo 1 – Enquadramento do trabalho e objetivos .....	1
Capítulo 2 – Considerações teóricas .....	4
2.1 – Composição do leite.....	4
2.2 – A flor de cardo como agente coagulante e proteolítico.....	7
2.3 – Transformação do leite em queijo.....	9
2.3.1 – Coagulação.....	9
2.3.2 – Maturação.....	11
2.3.2.1 – Glicólise .....	11
2.3.2.2 – Lipólise.....	12
2.3.2.3 – Proteólise.....	12
2.4 – Queijo de Évora .....	14
Capítulo 3 – Metodologias .....	16
3.1 – Amostragem .....	16
3.2 – Procedimento analítico.....	17
3.2.1 – Análises químicas.....	17
3.2.2 – Análises físicas.....	19
3.3 – Tratamento Estatístico.....	20
Capítulo 4 – Resultados .....	22
4.1 – Monitorização das propriedades físicas e químicas ao longo da cura.....	22
4.2 – Correlações de <i>Pearson</i> .....	30
4.3 – Análise em componentes principais.....	31
Capítulo 5 – Conclusões .....	37
Referências bibliográficas.....	39
Apêndice I .....	45

## Índice de figuras

Figura 1 – Modelo de estrutura da micela de caseína proposto por Schmidt em 1982 .....	7
Figura 2 – Representação gráfica da evolução das reações que ocorrem durante as fases da coagulação e representação esquemática do comportamento das caseínas (C) na presença de enzimas (E).....	10
Figura 3 – Evolução dos valores médios de humidade (a) e de humidade no queijo isento de gordura (HQG) (b) das amostras obtidas com coagulante animal e com os diferentes coagulantes vegetais: C1, C2 e C3 .....	23
Figura 4 – Evolução dos valores médios de gordura (a) e de gordura em matéria seca presente (b) das amostras obtidas com coagulante animal e com os diferentes coagulantes vegetais: C1, C2 e C3 .....	24
Figura 5 – Evolução dos valores médios de pH (a) e de acidez (b) das amostras obtidas com coagulante animal e com os diferentes coagulantes vegetais: C1, C2 e C3 .....	24
Figura 6 – Evolução dos valores médios das frações NT% (a), NSA% (b), NNP% (c), e NA% (d) das amostras obtidas com coagulante animal e com os diferentes coagulantes vegetais: C1, C2 e C3 .....	25
Figura 7 – Perfil de textura médio para amostras obtidas com o coagulante C1 com 1, 14, 35 e 60 dias cura.....	26
Figura 8 – Varrimentos de deformação exemplificativo à frequência de 1Hz .....	27
Figura 9 – Espectro mecânico exemplificativo das amostras obtidas com coagulante C1 com 1d, 14d, 35d e 60 dias cura.....	28
Figura 10 – Evolução dos valores médios da dureza (a), módulo conservativo (b) e adesividade (c) das amostras obtidas com coagulante animal e com os diferentes coagulantes vegetais: C1, C2 e C3 .....	28
Figura 11 – Evolução dos valores médios dos parâmetros de cor exterior L* (a), a* (b) e b* (c) das amostras obtidas com coagulante animal e com os diferentes coagulantes vegetais: C1, C2 e C3 .....	29
Figura 12 – Evolução dos valores médios dos parâmetros de cor interior L* (a), a* (b) e b* (c) das amostras obtidas com coagulante animal e com os diferentes coagulantes vegetais: C1, C2 e C3 .....	30
Figura 13 – Distribuição dos atributos no plano principal. ....	34
Figura 14 – Proj eção das amostras no plano principal .....	34
Figura 15 – Proj eção das amostras dos diferentes coagulantes C1, C2, C3 e A .....	35

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Composição média do leite (%m/m).....	5
Tabela 2 – Especificações do queijo de Évora DCP, de acordo com o Despacho nº 29/ 94 de 4 de fevereiro .....	15
Tabela 3 – Plano de amostragem realizado para este estudo .....	16
Tabela 4 – Valores de deformação (%) escolhidos a aplicar nos v arrimentos de frequência em diferentes tempos de cura.....	27
Tabela 5 – Resultados das correlações (r) e valores de significância (P) entre o módulo conservativo e a dureza em relação à humidade, ao pH, à acidez, e aos indicadores de proteólise (NP% e NA%). .....	31
Tabela 6– Valores próprios e extração dos componentes principais das diferentes amostras. ...	32
Tabela 7 – Coeficientes de correlação entre os valores dos atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.....	33



## Capítulo 1 – Enquadramento do trabalho e objetivos

O queijo é um produto muito apreciado na gastronomia portuguesa bem como em muitos outros países, podendo-se dizer que faz parte integrante da dieta mediterrânea. Esta é uma cultura alimentar que desde muito cedo procurou a produção sustentável de diferentes alimentos ao longo do ano. Como tal, a dieta mediterrânea compreende um conjunto variável de alimentos que vão desde água, infusões, caldos, aos cereais, aos hortofrutícolas, laticínios, englobam também o azeite e especiarias, entre outros. Em Portugal é utilizado a roda dos alimentos que incorpora os princípios da dieta mediterrânea, não só ao nível das recomendações alimentar como das porções a consumir.

Apesar de haver semelhanças entre muitos queijos Portugueses, também se encontram diferenças consoante a região, pelo facto de os recursos disponíveis variarem geograficamente. Assim, podem-se encontrar queijos de diferentes espécies: ovelha, vaca, cabra ou mistura, obtidos com diferentes coagulantes (animal e vegetal) e a partir de processos que podem ser muito semelhantes, nalguns casos, ou completamente diferentes, noutros. Os queijos portugueses protegidos com Denominação de Origem (DOP) apresentam uma característica transversal a todos: são obtidos a partir de leite cru.

Existe um grupo de queijos com características tecnológicas, sensoriais e texturais muito semelhantes em que o agente coagulante usado é a infusão de flor do cardo (*Cynara cardunculus* L.). Assim, pode destacar-se em Portugal queijos de ovelha como o “Serra da Estrela”, “Serpa”, de “Évora”, de “Nisa”, de “Azeitão”, entre outros, havendo outros países que utilizam a flor de cardo com a mesma finalidade, como seja o caso da produção dos queijos “La Serena”, “Quia” e “Torta del Casar” em Espanha (Brás *et al.*, 2016).

A *Cynara cardunculus*, vulgarmente conhecida como cardo, é uma planta herbácea perene, que pertence à família *Asteraceae*. Tem um ciclo de vida de 10 a 15 anos, cresce naturalmente em condições edafoclimáticas extremas, sendo resistente a temperaturas elevadas e ao stress hídrico. Desenvolve-se bem em solos secos, rochosos e não cultivados e que, por possuir um sistema radicular profundo (até 5 m de profundidade), consegue satisfazer as necessidades nutricionais da planta em condições climáticas desfavoráveis. Na sua fase adulta a planta pode atingir diferentes alturas e diâmetros, por norma a altura é cerca de 2 m, podendo espalhar-se por uma área de 1,5 m de diâmetro (Brás *et al.*, 2016).

A infusão de flor de cardo é obtida a partir dos pistilos da flor seca, geralmente colhidos no ano interior e mantidos em local seco. A tecnologia aplicada para a obtenção do extrato de flor de cardo não está padronizada, mas regra geral é obtido pela imersão dos pistilos em água durante várias horas, em que de seguida se realiza uma suave maceração e filtração em panos de algodão, resultando num extrato de cor acastanhada (Roseiro *et al.*, 2003).

A atividade coagulante dos extratos de flor de cardo deve-se à presença de proteinases aspárticas (ciprosinas, cardosinas e cinarases) (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999). A flor de *Cynara cardunculus* apresenta uma grande variedade de proteinases aspárticas, sendo que as cardosinas A e cardosinas B são as mais importantes em quantidade e em termos de especificidade pois os parâmetros cinéticos são semelhantes ao coagulante animal: a ação da cardosina A é semelhante à quimosina e a ação da cardosina B é semelhante à pepsina. A utilização das proteases de origem vegetal como coagulantes do leite tem despertado interesse na área da investigação, uma vez que estas enzimas substituem o coalho e a quimosina recombinante (Vioque *et al.*, 2000).

Vários autores (Medo *et al.*, 1996; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Vioque *et al.*, 2000; Fernández-Salguero *et al.*, 2003) têm vindo a estudar o comportamento das proteases presentes no extrato de flor de cardo, especialmente no que diz respeito à sua atividade proteolítica, à sua especificidade bem como o seu impacto na qualidade final do queijo. O facto de a preparação do extrato aquoso de flor de cardo ser um processo muito pouco controlado (ou padronizado) pode prejudicar o fabrico de queijo especialmente no rendimento e nas características organolépticas entre lotes, potenciando perdas económicas (Ordiales *et al.*, 2012).

Este trabalho prático está integrado no projeto ValBioTecCynara – “Valorização económica do Cardo (*Cynara cardunculus*): estudo da sua variabilidade natural e suas aplicações biotecnológicas”. É um projeto que visa abordar a caracterização genética, molecular, morfológica e bioquímica de diferentes variedades de cardo, explorando também novas rotas de produção desta flor potencializando a produção tradicional de queijos que beneficiam de Denominação de Origem Protegida (DOP), nomeadamente o Serpa, Évora e Nisa. Este projeto tem ainda como objetivo desenvolver novos produtos através dos compostos bioativos detetados na avaliação do perfil biológico e químico das folhas de *Cynara cardunculus*, visando a potenciação da indústria farmacêutica. A abordagem integrada promovida neste projeto potenciará, inequivocamente, a cultura de

cardo, associando-a a utilizações tecnológicas de elevado valor acrescentado (Brás *et al.*, 2016).

Acredita-se que as diferentes populações de cardo espontâneos, encontrados na região, poderão produzir ações específicas sobre o leite de ovelha e, subsequentemente no queijo, influenciando a coagulação e o processo de maturação, promovendo diferenciação no *flavour* e textura.

Deste modo, os objetivos deste estudo são monitorizar a evolução das propriedades sensoriais, reológicas e físico-químicas do queijo de Évora DOP, obtido a partir de flor de cardo, *Cynara cardunculus* L., colhido em diferentes populações de plantas da região Alentejo e, ainda, comparar a ação coagulante destes diferentes coagulantes vegetais com a do coalho.

## **Capítulo 2 – Considerações teóricas**

A qualidade do leite, e subsequentemente transformação do leite em queijo, está dependente do teor e características da caseína, da flora microbiana, do estado sanitário do animal, incidindo diretamente na qualidade da coalhada, na produtividade e no rendimento queijeiro. Deve ter-se em conta todos os processos que podem contribuir para a alteração da qualidade do leite, como a acidificação por atividade microbiana ou a suscetibilidade da gordura, a conservação deficiente do leite e ter em atenção a adequada refrigeração do leite (Martins & Vasconcelos, 2003).

A qualidade do leite é um dos fatores mais importantes na transformação de leite em derivados e é um tema muito debatido na literatura técnico-científica. Afeta diretamente as fases de fabrico como a coagulação, a sinérese, dessoramento e, principalmente, a maturação pois são fases em que as reações bioquímicas são quase irreversíveis e decisivas para a qualidade do queijo (Martins & Vasconcelos, 2003).

### **2.1 – Composição do leite**

Os leites comumente usados na produção artesanal de queijos portugueses são o leite de ovelha e de cabra, sendo também possível encontrar queijos produzidos com leite de vaca na região dos Açores.

Os valores da composição média dos leites podem variar entre si devido a fatores ligados ao animal e ao produtor, como a raça, a dieta adotada e o estado da lactação. Por outro lado, existem outros fatores ligados às condições edafoclimáticas, como a localização geográfica e ambiental, que também influenciam a qualidade do leite. Todos estes fatores de tipicidade e especificidade dos queijos tradicionais podem ser controlados e monitorizados pela intervenção humana (Martins & Vasconcelos, 2003).

Como tal, a composição do leite entre as diferentes espécies difere no que diz respeito às proteínas, gordura e lactose (tabela 1). Para além disso, podem ainda haver variações destes valores dentro da própria espécie dependendo dos fatores acima mencionados.



Tabela 1 – Composição média do leite (%m/ m).

	Vaca	Ovelha	Cabra
Água	88,2	81,2	87,7
Proteínas das quais:	3	6,8	3,3
Proteínas insolúvel*	78,0	80,0	75,6
Proteínas solúvel*	17,0	17,6	15,7
Azoto não proteico*	5,0	2,4	8,7
Gordura	3,6	6,8	3,6
Lactose	4,5	5,1	4,6

Legenda: \* Representa a percentagem referida ao azoto total

Fonte: Adaptado por Silva (2004) a partir de diversos autores (Alais, 1985; Alonso 2001; Ferreira, 2003).

O leite de ovelha é mais rico em proteína, gordura e sólidos totais comparativamente ao leite de vaca e cabra. Assim, é possível obter um rendimento queijeiro superior, resultando em coalhadas mais firmes (Martins, 1989).

Segundo Alais (1985), o leite é uma mistura quer do ponto de vista físico quer do ponto de vista químico. A nível das propriedades físicas porque coexistem no leite vários estados como a emulsão, suspensão coloidal e a solução. Do ponto de vista químico porque é possível encontrar diversos compostos como lactose, gordura, proteínas, albuminas, sais, etc. É um sistema dinâmico devido à instabilidade das estruturas do leite. Esta instabilidade deve-se essencialmente às membranas dos glóbulos de gordura, à alteração da solubilidade de vários constituintes em função da temperatura e do pH devido à presença de várias enzimas que podem modificar alguns dos constituintes através dos processos de lipólise e proteólise (Pinho, 2003).

A gordura, ou matéria gorda, encontra-se no leite em emulsão na forma de glóbulos de gordura. Estes glóbulos são secretados pela glândula mamária e são compostos maioritariamente por triglicéridos, rodeados por dupla camada lipídica similar. Os triglicéridos representam 98% da fração lipídica sendo que os restantes 2% são constituídos por diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos gordos, fosfolípidos e esteróis (Pinho, 2003).

No caso do leite de ovelha, os glóbulos de gordura têm uma dimensão inferior quando equiparados aos glóbulos de gordura presentes no leite de vaca (Park *et al.*, 2007). A gordura do leite influencia diretamente as propriedades reológicas do queijo. É a responsável por diversas funções, funciona como plastificante para textura, promove o

sabor pela formação de ácidos gordos e solubilizam os compostos do *flavour* produzidos a partir dos macronutrientes do leite (Pinho, 2003).

A lactose é o principal hidrato de carbono presente no leite, sendo o responsável pelo equilíbrio da pressão osmótica do leite. A síntese de lactose resulta da conversão de uma molécula de glucose em UDP-galactose que se liga a outra molécula de glucose, catalisada pela enzima lactose-sintetase. A lactose do leite desempenha funções sobre os derivados, especialmente no processo de fermentação, onde a lactose é fermentada pelas bactérias ácido-lácticas dando origem a ácido láctico (Pinho, 2003).

O teor de proteínas presentes no leite pode variar muito consoante o tipo de dieta do animal e representa cerca de 95% dos componentes azotados. No leite de ovelha a fração azotada não proteica encontra-se em menor porção comparativamente ao leite das outras espécies. Assim, o teor de proteínas coaguláveis enzimaticamente é superior potenciando um maior rendimento queijeiro (Monteiro, 1998). As proteínas do leite englobam proteínas insolúveis (caseínas) e solúveis (proteínas do soro). Simplificando, pode-se referir que as caseínas são compostas por 4 tipos de cadeias polipeptídicas:  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ -e  $\kappa$ -caseínas. Estas cadeias encontram-se organizadas em estruturas coloidais e esféricas, designadas por micelas de caseína (Alais, 1985).

O modelo de estrutura da micela de caseína mais aceite pela literatura foi proposto em 1982 por Schmidt (Brule & Lenoir, 1987). Este modelo é um modelo sub-micelar em que a  $\kappa$ -caseína está mais presente na superfície da micela e desempenha um papel fundamental na estabilidade do coloide (figura 1). Sendo o centro hidrofóbico ocupado pela  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2- e  $\beta$ -caseínas, estas ligam-se entre si através de ligações fosfatocalcúcio, enquanto que na parte exterior as  $\kappa$ -caseínas são fosforiladas pelo aminoácido SR (serina), formando grupos de fosfatos. Este grupo de fosfatos são esterificados formando monoésteres de serina) promovendo uma forte agregação das sub-micelas (Alais, 1985).

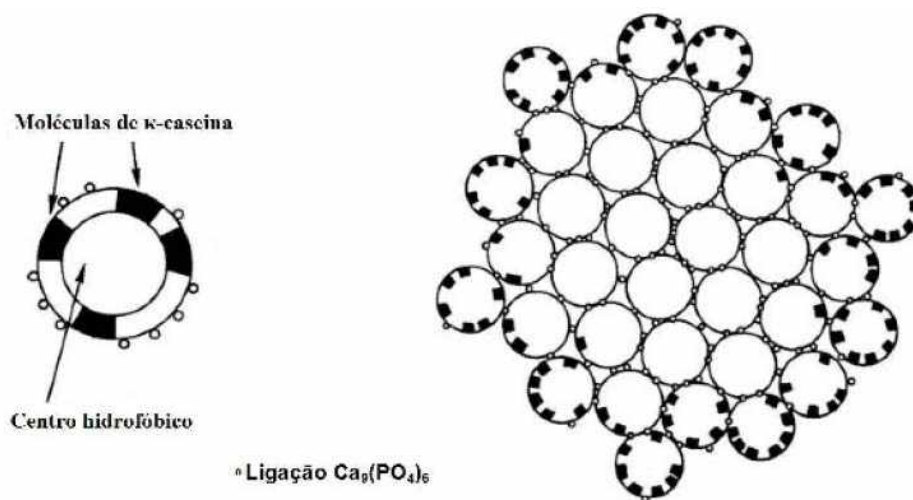


Figura 1 – Modelo de estrutura da micela de caseína proposto por Schmidt em 1982 (Alais, 1985).

Esta estrutura da micela de caseína é sensível a fatores externos como a presença de enzimas coagulantes, pH e temperatura (ou combinação entre estes), fatores extremamente importantes e que influenciam a qualidade final dos queijos (Alarenga, 2008).

A transformação do leite em queijo deve-se essencialmente à concentração de componentes sólidos na coalhada, principalmente proteínas e gordura. A composição do leite é de extrema importância para o rendimento queiro pois influencia a coagulação enzimática, a firmeza da coalhada, a sinérese e a textura do queijo. (Paula *et al.*, 2009). Todavia, também é necessário ter em atenção o tipo de agente coagulante pois é o principal responsável pela variabilidade das características do queijo (Oncção *et al.*, 2018).

## 2.2 – A flor de cardo como agente coagulante e proteolítico

Nos últimos anos tem-se observado um interesse crescente na investigação e no estudo da flor de cardo. Inicialmente, vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de compreender a influência das proteases presentes no extrato de flor de cardo em queijos, especialmente em queijos de ovelha. Roa *et al.* (1999), que estudaram o comportamento da *Cynara cardunculus* no queijo La Serena, afirmam que nestes queijos o agente coagulante hidrolisa mais de 75% das  $\alpha$ - e  $\beta$ -caseínas. Afirma ainda que é possível encontrar uma fração residual de proteinases do extrato de flor de cardo na coalhada (cerca de 27% do total adicionado ao leite) e que as mesmas terão o seu efeito na maturação. Os autores verificaram ainda que estes queijos apresentam uma lenta degradação da  $\alpha$ -caseína no início da maturação, ao contrário da  $\beta$ -caseína que demonstrou ter uma proteólise mais rápida nos

primeiros 30 dias de cura, demonstrando ter um nível de proteólise superior quando comparado ao coagulante animal. Em 2003, Fernández-Salguero *et al.*, estudaram a influência de um recombinante de cipsosinas do cardo nas propriedades físico-químicas e microbiológicas do queijo de ovelha (tipo-Manchego) durante 4 meses, em comparação com o coagulante animal. Os autores verificaram que não houve diferenças significativas na maioria dos parâmetros químicos entre os dois tipos de coagulantes, porém afirmam que os queijos produzidos com o recombinante de cipsosinas evidenciaram uma proteólise mais rápida e marcante quando comparado ao coalho, apresentando valores de fração azotada maiores no final da cura. Ao encontro vão os resultados obtidos por Delgado *et al.* (2010), que estudaram a proteólise dos queijos Torta Del Casar, os autores verificaram que as  $\alpha$ -caseínas na fase inicial tem uma degradação lenta até aos primeiros 30 dias, sendo esta intensificada até aos 60 dias de maturação, ao passo que as  $\beta$ -caseínas na fase inicial demonstraram ter uma degradação mais rápida nos primeiros 30 dias, estabilizando até ao final da cura.

Embora os resultados encontrados na literatura sejam semelhantes e apresentem a mesma linha de tendência, é possível encontrar uma heterogeneidade nas características dos queijos produzidos nas mesmas condições, facto este que está directamente associado à falta de padronização e/ou de composição homogénea deste agente coagulante (Ordiales *et al.*, 2012). Assim, tornou-se necessário compreender a composição dos ecótipos e a sua influência específica sobre as propriedades dos queijos de ovelha. Define-se como ecótipo as populações que dentro da mesma espécie apresentam diferenças genotípicas entre si, devido à adaptação da planta nos diferentes locais ou regiões (Miles, 2005). Ordiales *et al.* (2013), estudaram a influência de 3 ecótipos de cardo nos queijos Torta Del Casar e evidenciaram que: (1) uma maceração de 24h promove uma maior atividade coagulante sobre as caseínas, influenciando as características finais da coalhada (maior viscosidade); (2) o ecótipo com maior atividade proteolítica influencia a acidez, o sabor e a maturação e; (3) o ecótipo mais adequado deve apresentar uma atividade coagulante mais elevada e uma atividade proteolítica moderada relativamente à  $\beta$ -caseína.

Em 2015, Guiné *et al.* (2015), estudaram a influência de 6 ecótipos de cardo em queijo da Serra da Estrela e verificaram alguma variabilidade nos valores obtidos, confirmando que o ecótipo de cardo utilizado influencia as propriedades químicas dos queijos bem como a textura e a cor. Em concordância, Correia *et al.* (2016) que estudaram a influência de 6 ecótipos de cardo em diferentes tempos de coagulação e a sua influência para os parâmetros

físicos do queijo como a textura, a dureza e a cor, verificaram que o ecótipo com maior atividade coagulante apresentou maior concentração de cardosinas e que o ecótipo escolhido influencia diretamente o tempo de coagulação bem como os parâmetros de cor e textura, reforçando mais uma vez a ideia da importância da padronização do coagulante de extrato de flor de cardo.

## **2.3 – Transformação do leite em queijo**

O fabrico do queijo envolve várias fases que vão desde a preparação da matéria-prima ao acabamento final. A tecnologia é adaptada aos diferentes tipos de queijos sendo que os processos principais são os mesmos: coagulação, sinérese, dessoramento e maturação ou cura, podendo haver variações consoante o tipo de queijo que se pretende produzir.

### **2.3.1 – Coagulação**

A coagulação é a primeira etapa essencial à transformação do leite em queijo. A coagulação pode ser promovida por ação de enzimas, de origem animal ou vegetal, ou por acidificação do meio normalmente promovida por agentes microbianos. Existe ainda a coagulação mista, em que ambos os processos atuam em simultâneo (Brulé & Lenoir, 1987). Regra geral, na produção de queijos deovelha tradicionais portugueses, o agente coagulante mais utilizado é o extrato aquoso da flor do cardo (*Cynara cardunculus* L.) devido à ação das proteases aspárticas, das quais se destacam a cardosina A e cardosina B. O coalho é uma mistura de enzimas (quimosina e pepsina) e pode ser de origem animal ou microbiano. No coalho, a quimosina é a maior responsável pela coagulação, podendo-se dizer que esta enzima tem uma elevada atividade proteolítica específica. Segundo Martins (2006) as enzimas existentes no extrato aquoso do cardo são mais resistentes ao calor tendo atividade proteolítica até aos 70°C, enquanto que a quimosina perde atividade a partir dos 40°C.

Após a preparação do leite, o extrato aquoso de flor de cardo é adicionado e homogeneizado por agitação, seguido de um repouso onde se inicia o processo de coagulação (Pires *et al.*, 1994). Durante a coagulação do leite dão-se várias reações pela ação de enzimas coagulantes (figura 2), podendo-se destacar duas fases essenciais. A primeira fase ou fase primária, dá-se devido à presença de enzimas, neste caso a cardosina A (ou quimosina no caso do coagulante animal) em que a enzima ataca a proteína estabilizadora da micela ( $\kappa$ -caseínas). Na fase secundária, ocorre a agregação e a formação de gel, por associação das micelas modificadas pela ação das enzimas (Brulé & Lenoir, 1987).

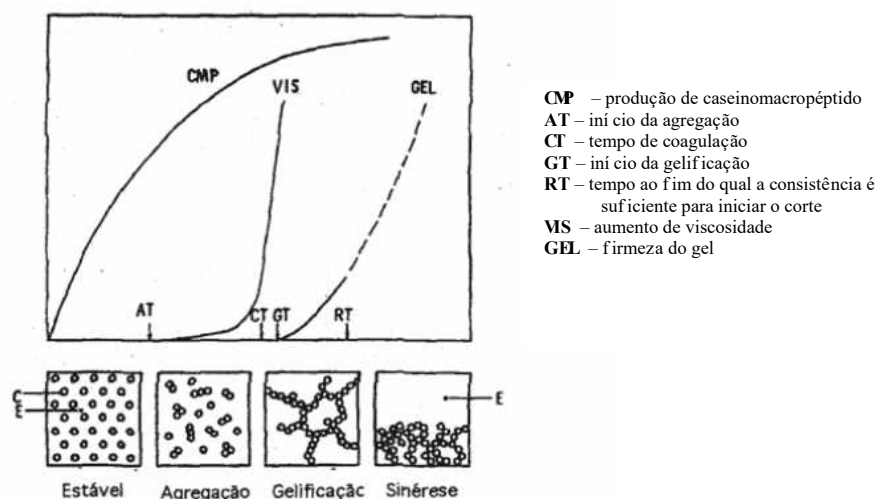


Figura 2 – Representação gráfica da evolução das reações que ocorrem durante as fases da coagulação e representação esquemática do comportamento das caseínas (C) na presença de enzimas (E) (Fonte: Van Hooijdonk e Van den Berg, 1988, adaptado por Martins & Vasconcelos 2003).

Assim, na fase inicial a enzima coagulante hidrolisa a ligação peptídica existente entre a posição 105 e 106 constituída por aminoácidos fenilalanina e metionina, respectivamente, da  $\kappa$ -caseína (Phe105-Met106). Este corte da ligação peptídica divide a  $\kappa$ -caseína em dois peptídeos: o resíduo glicomacropéptido (CMP), que é solúvel, hidrofílico e que tem na sua constituição os aminoácidos 106 a 169 e que faz parte integrante do soro do leite; e o resíduo para- $\kappa$ -caseína - insolúvel, hidrofóbico, constituído pelos aminoácidos 1-105, o qual permanece ligado às  $\alpha$ S1- e  $\beta$ -caseínas e que, por ser altamente hidrofóbico e alcalino, promove a destabilização da caseína, permitindo que as restantes caseínas, sensíveis ao cálcio, iniciem um processo de agregação micelar captando o cálcio iónico disponível na solução e obrigando a micela a uma nova reestruturação coloidal. Nesta fase intervêm, para além dos fatores relacionados com o leite, os fatores essencialmente ligados à atividade enzimática, a concentração em enzima, o pH e a temperatura (Alais, 1985). As proteinases aspárticas presentes no extrato de flor de cardo relevam grande afinidade para quebrar as ligações peptídicas da  $\kappa$ -caseína, desencadeando o processo enzimático da coagulação do leite e, subsequentemente, agindo sobre  $\alpha$ S1- e  $\beta$ -caseínas (Sarmiento *et al.*, 2009).

A segunda fase, também designada de fase de agregação micelar, é uma fase que resulta da nova reestruturação das cadeias e é uma fase essencialmente física em que, devido à formação do gel, há um aumento gradual da viscosidade promovido pelas ligações cada vez mais fortes da caseína (ligações intramicelares), aprisionando os componentes solúveis

e insolúveis do leite, como a matéria gorda (processo de gelificação). Esta segunda fase é sensível à concentração de cálcio iônico e à temperatura (Martins & Vasconcelos, 2003).

Simultaneamente a fase enzimática vai continuando a atuar sobre as caseínas ainda livres promovendo o fenómeno de agregação micelar e formando redes proteicas cada vez de maior dimensão (gelificação ou coalhada), do qual resulta uma última e terceira fase, a sinérese em que, devido ao aumento da consistência do gel, há exsudação do soro do leite (Martins & Vasconcelos, 2003). Assim, após a sinérese, permanece na coalhada uma fração residual das enzimas da flor de cardo que desempenham um papel muito específico nas propriedades do queijo de ovelha, especialmente na textura (Galán *et al.*, 2012). Nesta fase já é possível adotar técnicas para promover a exsudação do soro como o corte e o dessoramento. O dessoramento é um processo que promove a aceleração da expulsão do resto do soro presente e que é controlado de forma a se conseguir um produto moldável e com as mesmas condições (Martins & Vasconcelos, 2003).

### **2.3.2 – Maturação**

A maturação é a etapa final do processamento do queijo e é considerada a fase mais empírica dada à complexidade das transformações que ocorrem. A fase de maturação está dependente das características finais da coalhada como teor de gordura e de caseína, o pH, a acidez e a atividade da água ( $a_w$ ), sendo que também está dependente das condições ambientais da cura como a temperatura, a humidade relativa e a velocidade do ar, que regulam a atividade coagulante ao longo da maturação (Martins, 2006).

Durante este período ocorrem três eventos bioquímicos primários a glicólise, a proteólise e a lipólise. Estas reações primárias são responsáveis pelas alterações ocorridas durante a cura e determinam a textura e o desenvolvimento do *flavour* básico dos queijos. No entanto, numerosas modificações secundárias ocorrem paralelamente e, não só são responsáveis pelo desenvolvimento do *flavour* como também contribuem para modificar a textura. Ou seja, da fase da maturação resultam uma vasta diversidade de novos compostos devido à atividade das enzimas de origem microbiológica, do agente coagulante e também pelas enzimas nativas do leite (Fox *et al.*, 1999).

#### **2.3.2.1 – Glicólise**

Ao longo da transformação de leite em queijo a maior parte da lactose é extraída na remoção do soro. No entanto, na coalhada permanece sempre alguma lactose residual que vai ser rapidamente convertida em ácido láctico através da ação das bactérias lácticas, promovendo

acidificação do meio e a desmineralização das micelas de caseína (Lawrence *et al.*, 1987). De acordo com Fox *et al.* (1999), este é um processo complexo e extenso mas essencial para a qualidade do queijo e que está dependente da quantidade de sal da coalhada.

No entanto, existem ainda outros microrganismos capazes de fermentar os monossacáridos da lactose que podem produzir compostos indesejáveis produzindo defeitos no queijo. Um exemplo disso, é a presença de coliformes que transformam a lactose em ácido láctico, em ácido acético e ácido fórmico ou a presença de leveduras que podem transformar a lactose em ácidos orgânicos, em álcool, em acetaldeído e em CO<sub>2</sub> (Dumais *et al.*, 1991).

### 2.3.2.2 – Lipólise

A lipólise é o processo de hidrólise dos lípidos em que, pela ação das lipases naturais do leite e das lipases microbianas, se desenvolvem compostos que contribuem para o aroma e cheiro característico do queijo, promovido pela libertação de ácidos gordos voláteis (Silva, 2001). A hidrólise dos lípidos contribui para o *flavour* devido à formação de compostos de degradação sendo por isso um processo fundamental para o sabor e para a textura (Pinho, 2003). De forma a inativar completamente as lipases naturais do leite é necessário um tratamento térmico (cerca de 78° C durante 10 segundos). Assim, queijos obtidos a partir de leite cru estão sujeitos à ação destas enzimas lipolíticas, que são específicas para a posição 3 do triglicérido, onde na gordura do leite o ácido butírico (C<sub>4</sub>) se encontra preferencialmente esterificado, o que explica a concentração elevada deste ácido nalguns tipos de queijo (Fox *et al.*, 1999). Macedo *et al.* (1996), que estudaram queijos coagulados com extratos de flor de cardo, afirmam que estes queijos apresentam atividade lipolítica significativa.

### 2.3.2.3 – Proteólise

A proteólise é o principal responsável pelas mudanças de textura e pela libertação de compostos precursores dos compostos aromáticos, contribuindo de forma significativa para o *flavour* final do queijo (Pinho, 2003). A matriz proteica vai sofrendo mudanças estruturais durante a cura. Nos primeiros dias de maturação, os agregados de caseína perdem a sua forma esférica devido aos fenómenos ocorridos durante a coagulação, sendo que no decorrer da cura vão ocorrendo processos de hidrólise nas proteínas fibrosas, levando à formação de redes proteicas com estruturas cada vez mais homogêneas (Alvarenga, 2008).

Devido à diversidade das proteínas do leite, à variedade da flora existente e à variedade das enzimas proteolíticas, o processo de proteólise é muito complexo podendo ser promovido



pelas enzimas do agente coagulante, as proteases, as peptidases do fermento láctico e/ ou da flora secundária, bem como pelas enzimas naturais do leite (Dunais *et al.*, 1991; Fox *et al.*, 1999).

Embora a maior parte das enzimas coagulantes do extrato de flor de cardo seja extraída durante a sinérese, é possível encontrar proteinases residuais que permanecem no queijo. Estas proteinases residuais contribuem para a proteólise da caseína, tendo impacto na definição das propriedades do queijo, especialmente para a textura (Conceição *et al.*, 2018). As enzimas responsáveis pela proteólise são as endoproteinases e as exopeptidases. As endoproteinases tem como principal função quebrar as ligações peptídicas específicas no interior das cadeias polipeptídicas, semelhante à especificidade da quimosina para a ligação Phe105-Met106 da  $\kappa$ -caseína. Pelo contrário, as exopeptidases hidrolisam um ou mais aminoácidos de cada vez, em ambas as extremidades N-terminal (aminopeptidases) e C-terminal (carboxipeptidases) dos polipeptídeos (Raksakulthai *et al.*, 2002).

O sistema enzimático presente nos extratos de flor do *Cynara cardunculus* são constituídos por 3 formas de proteases ácidas (I, II e III) em que as formas II são similares, agrupando-se e formando então o grupo designado por cardosina A. A forma III é designada por cardosina B. O complexo enzimático cardosina A apresenta semelhanças com a quimosina, enquanto que a cardosina B com a pepsina. Ou seja, a ação proteolítica da cardosina A é mais específica enquanto que a ação da cardosina B não é tão específica. Por outro lado, as enzimas vegetais demonstram ter maior capacidade proteolítica que as enzimas animais e são específicas para um maior número de ligações peptídicas (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999).

A proteólise pode ser subdividida em dois tipos: a proteólise primária e a proteólise secundária. A proteólise primária é um indicador do grau de hidrólise das caseínas em peptídeos solúveis em água e é determinada pelo quociente entre o azoto solúvel em água e o azoto total. A proteólise secundária é um indicador do grau de profundidade da proteólise, determinado pelo quociente entre o azoto não proteico ou azoto aminoacídico e o azoto total, sendo que indica até que ponto os peptídeos foram degradados em peptídeos de menor dimensão ou em aminoácidos. Queijos elaborados com extrato de cardo apresentaram uma proteólise mais intensa que os obtidos com coalho ou coagulantes microbianos (Roa *et al.*, 1999; Freitas & Milcata, 1996; Tejada *et al.*, 2008; Delgado *et al.* 2010). No entanto, para ambos os queijos, o grau de profundidade da proteólise é semelhante. Assim, é possível afirmar que o coeficiente de maturação depende das enzimas do agente coagulante

enquanto que o grau de profundidade da proteólise depende das enzimas microbianas das bactérias lácticas (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999).

A proteólise ocorrida na cura do queijo de ovelha também depende da tecnologia usada na sua produção. Por exemplo, observa-se que a pasteurização do leite tem uma influência marcada na proteólise: a degradação das  $\kappa$ - e  $\beta$ -caseínas é mais intensa em queijo obtido a partir de leite cru, enquanto que as  $\alpha$ S2-caseínas é mais intensa em queijo obtido a partir de leite pasteurizado (Gaya *et al.*, 2005). Assim, a proteólise contribui para as alterações organolépticas do queijo de diferentes formas (Fox *et al.*, 1999): libertação de aminoácidos e péptidos, que podem estar associados ao sabor amargo e ao possível catabolismo dos aminoácidos, promovido pela formação de compostos que influenciam o *flavour* como aminas, ácidos, tióis, tioésteres, entre outros; libertação de compostos precursores de compostos sápidos sentidos durante a mastigação; aumento do pH devido à produção de compostos alcalinos dos quais se destaca o  $\text{NH}_3$ ; e colapso da rede proteica e captação da água, devido à formação de grupos amina e carboxilo.

## 2. 4 – Queijo de Évora

O queijo de Évora é produzido com leite de ovelha e tem como agente coagulante o cardo. Segundo o despacho nº 29/ 94 “entende-se por queijo de Évora um queijo curado, de pasta dura ou semidura, com poucos ou nenhuns olhos e ligeiramente amarelada, obtido por esgotamento da coalhada, após a coagulação do leite cru de ovelha, estreme, por ação do Cardo (*Cynara cardunculus* L.)”.

A tabela 2 apresenta as características específicas que definem o queijo de Évora, a mesma está de acordo com a Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR), que detém o caderno de especificações do Queijo de Évora e de acordo com a legislação em vigor - Regulamento CE nº 1107/ 96 de 12 de Junho de 1996 e despacho nº 29/ 94 de 4 de Fevereiro de 1994, que definem as características do queijo de Évora DOP.

Tabela 2 – Especificações do queijo de Évora DOP, de acordo com o Despacho nº 29/ 94 de 4 de fevereiro

<b>Forma</b>	Cilíndrico baixo (prato), abaulamento lateral e ligeiro na face superior, sem bordos definidos.			
<b>Dimensões e pesos</b>		Diâmetro (cm)	Altura (cm)	Peso (g)
	Pequenos de pasta dura	6 a 8	2 a 4	60 a 90
	Meio-moedas de pasta dura	12 a 14	2 a 4	120 a 200
	Meio-moedas de pasta semidura	13 a 15	1,5 a 3	200 a 300
<b>Crosta</b>	Consistência	Dura e semi-dura		
	Aspetto:	Inteira, bem formada Lisa ou ligeiramente rugosa		
	Cor	Amarela, escurecendo em contacto com o ar		
	Textura	Fechada e bem ligada		
<b>Definições da Pasta</b>	Aspetto	Úmida e com alguns olhos pequenos		
	Cor	Amarela uniforme		
	Aroma e sabor	Cheiro e sabor característicos, ligeiramente picante e acidulados, sendo mais acentuado nos queijos de pasta dura.		
		Teor de humidade (%) <sup>1</sup>	Teor de gordura (g) <sup>2</sup>	
<b>Maturação</b>	Pasta dura	49-56	45-60	
	Pasta semidura	54-63		
	Condições ambientais	Temperatura	Humidade	Tempo mínimo
		8-15	80-95	Pasta semidura: 30 dias Pasta dura: 90 dias

<sup>1</sup> Referido ao queijo isento de gordura

<sup>2</sup> Referido ao extrato seco

Constituem estas características a sua área geográfica, a sua conformação e as suas propriedades físico-químicas e organoléptica. Oleite de ovelha provém maioritariamente da raça Merino. A área geográfica DOP para o distrito de Évora abrange os concelhos de Alandroal, Arraiolos, Avis, Borba, Estremoz, Évora, Fronteira, Montemor-o-Novo, Mourão, Portel, Redondo, Reguengos de Monsaraz, Sousel, Vendas Novas, Viana do Alentejo e Vila Viçosa (Despacho nº 29/ 94 de 4 de fevereiro).

## Capítulo 3 – Metodologias

O trabalho prático foi realizado no laboratório de Lactícios e Reologia Alimentar, do departamento de Tecnologia e Ciências Aplicadas da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja.

Os queijos produzidos na queijaria Cachopa em Évora de acordo com as especificações DOP, onde foram utilizados 3 extratos de flor de cardo provenientes de zonas alentejanas (3 populações) e um coalho, como testemunho.

### 3.1 – Amostragem

Foram utilizados 4 códigos diferentes relativamente ao coagulante. O coagulante codificado por A, corresponde ao coalho da marca comercial Enzilab (85% de quimosina / 15% de pepsina). Os restantes coagulantes correspondem a três populações diferentes de *Cynara Cardunculus* L.: **C1** – recolhido na Herdade do Peral (38°31'49.7"N 7°21'14.0"W); **C2** – recolhido na Herdade da Abóbada (37°57'36.6"N 7°25'00.7"W) e **C3** – recolhido na Herdade da Revilh eira (38°28'02.9"N 7°28'30.4"W). Para cada coagulante foram efetuados dois lotes de fabrico (um de manhã e um de tarde) e, em cada lote, foram recolhidas duas amostras, portanto n=4. Para cada amostra, foi monitorizada a evolução das propriedades ao longo da cura, entre os 0 e 90 dias, de acordo com a tabela 3. Devido às dimensões das amostras serem pequenas (cerca de 125g em curado), optou-se pela amostra composta. Assim, uma unidade de amostra corresponde a 5 queijos.

Tabela 3 – Plano de amostragem realizado para este estudo

Tipo de Amostra	Número de amostras	Descrição
Nº de lotes fabricados	2	1 de manhã + 1 de tarde
Nº de réplicas por lote	2	
Nº de coagulantes	4	3 ecótipos de <i>C. cardunculus</i> + 1 Animal
Tempo de cura	9	1, 3, 7, 14, 21, 35, 49, 60 e 90 dias
Total de Amostras	144	

Nota: cada unidade de amostra corresponde a 5 queijos de cerca de 125 g (em curado).

### 3. 2 – Procedimento anal í tico

As amostras foram transportadas desde a queijaria até ao laboratório, devidamente acondicionadas em papel vegetal e mantidas em caixa isotérmica. Na receção das amostras deixou-se estabilizar a temperatura ambiente ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Posteriormente, determinou-se a cor, a análise de perfil de textura e o pH. Estas determinações foram efetuadas nas 5 unidades individuais de amostra composta. Foram ainda retiradas 3 lâminas (em 3 das 5 unidades de amostra composta), com 1,5 mm de espessura e 25 mm de diâmetro, acondicionadas a  $2 \pm 1^\circ\text{C}$  com película aderente, para posterior análise em reómetro. Às cinco unidades de queijo foi retirada a crosta, foram trituradas, misturadas e armazenadas a  $2 \pm 1^\circ\text{C}$ , para as análises realizadas imediatamente e a  $-80^\circ\text{C}$ , para análises a efetuar posteriormente.

Nos dias seguintes, na porção refrigerada a  $2 \pm 1^\circ\text{C}$ , foram realizadas as análises de determinação da humidade, gordura e acidez. As restantes análises como os azotos totais, azotos solúveis em água, azotos solúveis em ácido tricloroacético e azoto aminoacídico foram realizadas posteriormente, na porção congelada a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 3. 2. 1 – Anál ises químicas

Os reagentes químicos usados para a realização deste trabalho têm como marcas comerciais: Merck, Panreac, Riedel, Sigma, Fluka, todos com uma pureza mínima do tipo pró-análise (p.a.), de acordo com as normas ACS (American Chemical Society) ou ISO (International Standard Organization).

##### pH

A determinação do pH foi efetuada diretamente na pasta do queijo, sem diluições, à temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Para isso utilizou-se um potenciómetro, marca Metrohm e modelo 691, munido de um eletrodo de penetração (Metrohm, Switzerland). Precisão do método:  $\pm 0,01$  (escala Sorensen). Realizaram-se 5 réplicas em cada amostra, uma por unidade de amostra composta.

##### Humidade (H)

A Humidade foi determinada segundo o método gravimétrico (AOAC, 1990b), por secagem em estufa (Mettler Model 400, Alemanha) de ar a  $101 \pm 1^\circ\text{C}$ , até obtenção de um mínimo de massa. Os resultados foram obtidos pelas diferenças de massas após a secagem e foram expressos em percentagem. Realizaram-se 2 réplicas para cada amostra.

### **Gordura (G)**

O teor em gordura foi determinado segundo o método de Van Gulik (NP 2105; ISO3432), e que consiste na separação da fase gorda da amostra por centrifugação (1200 rpm), num butirómetro Van Gulik, após dissolução das proteínas do queijo pelo ácido sulfúrico e com a separação da gordura facilitada pela adição de uma pequena quantidade de álcool isoamílico. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m). Precisão do método:  $\pm 0,1\%$  (m/m). Realizaram-se 2 réplicas para cada amostra. A partir dos valores de humidade e da gordura foi determinada a humidade referente aos queijos secos de gordura (HQG) e a gordura no resíduo seco (GRS).

### **Acidez total (A)**

A acidez total efetuou-se por titulação com solução alcalina (Hidróxido de Sódio 0,1N), na presença de indicador de fenolftaleína, após extração com água a 40°C (AOAC, 1990a). Os resultados foram expressos em cm<sup>3</sup> de solução alcalina normal (1 N) necessários à neutralização dos ácidos existentes em 100 g de queijo. Precisão do método:  $\pm 0,01$  cm<sup>3</sup> NaOH/100g. Realizaram-se 2 réplicas para cada amostra.

### **Azoto total (NT)**

O azoto total determinou-se pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990c) e consistiu em utilizar um digestor marca Tecator 2015 e um destilador Tecator Kjeldtec 1030 Auto Analyser (Tecator, Sweden). Este método tem como fundamento a mineralização da amostra em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a quente (processo de digestão), na presença de uma mistura catalisadora metálica (sulfato de potássio e sulfato de cobre). A digestão ácida leva à conversão de todo o azoto (N) em ião amónio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) que posteriormente é convertido em amoníaco (NH<sub>3</sub>) através da destilação em corrente de vapor, após adição de hidróxido de sódio, o destilado é recolhido em solução de ácido bórico. Os resultados foram obtidos pela titulação com ácido clorídrico de título conhecido e o volume gasto foi transformado em percentagem (m/m). Precisão do método:  $\pm 0,01\%$  (m/m). Realizaram-se 2 réplicas para cada amostra.

### **Azoto solúvel em água (NSA)**

O azoto solúvel em água foi quantificado a partir de uma extração aquosa dos componentes azotados (Kuchroo & Fox, 1982), utilizando água aquecida 40  $\pm$  1 °C, de modo a obter uma emulsão homogénea, com volume rigorosamente conhecido. Adicionou-se umas gotas de

formalina de forma a conservar a mistura e a mesma permaneceu em repouso durante 12 horas. Posteriormente procedeu-se à extração dos componentes solúveis. Filtrou-se e determinou-se o teor em azoto numa alíquota, pelo método de Kjeldahl. Os resultados foram expressos em percentagem (m/ m) e em percentagem relativamente ao azoto total (NSA%). Precisão do método:  $\pm 0,01\%$ (m/ m). Realizaram-se 2 réplicas para cada amostra.

#### **Azoto não proteico (NNP)**

A amostra de queijo foi tratada com ácido tricloroacético a 12% onde todas as proteínas foram precipitadas e depois filtradas com papel de filtro Whatman. O azoto não proteico foi determinado numa alíquota do filtrado pelo método Kjeldahl. Os resultados foram expressos em percentagem (m/ m) e em percentagem em relação ao azoto total (NNP%). Precisão  $\pm 0,01\%$ (m/ m). Realizaram-se 2 réplicas para cada amostra.

#### **Azoto aminoacídico (NA)**

Para a determinação do azoto aminoacídico usou-se a reação colorimétrica da ninidrina, é uma técnica para determinar a presença de grupos de aminoácidos livres, por espectrofotometria de absorção molecular, a um comprimento de onda de 570 nm (More, 1968). O espectrofotómetro utilizado foi o Shimadzu UV-160A (Alemanha). Os resultados foram expressos em mg Leu/ g queijo e em percentagem relativamente ao azoto total (NA%). Realizaram-se 2 réplicas para cada amostra.

### **3. 2. 2 – Análises físicas**

#### **Análise de perfil de textura (TPA)**

Para a análise da textura, recorreu-se ao texturómetro TA-HDi (Stable Micro Systems, Inglaterra). O teste foi realizado em penetração na pasta, com uma sonda cilíndrica de 20 mm de diâmetro, à temperatura de  $20 \pm 1$  °C. Relativamente ao parâmetro da textura, as condições de teste programadas foram velocidade de teste 1,00 mm/s, tempo de repouso entre o primeiro e o segundo ciclo 5 s, profundidade de penetração da sonda 10 mm (1 repetição por unidade / 5 réplicas por amostra). Foram assim obtidos os gráficos força vs tempo (ver figura 7 / capítulo 4.1) onde se calculou o parâmetro dureza (força máxima, N) e adesividade (área negativa, -Ns). Não foi possível realizar a análise para os 90 dias por as amostras se apresentarem muito duras.

### **Parâmetros viscoelásticos (SAOS)**

As medições oscilatórias de baixa amplitude (SAOS) foram realizadas a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , num reómetro de deformação controlada (Kinexus pro+ rheometer, Malvern instruments, Reino Unido), com a geometria de pratos paralelos com 20 mm de diâmetro, cerrados para prevenir a derrapagem da amostra (Rosenberg *et al.*, 1995).

Para determinar o limite da viscoelasticidade linear (LVE) foram efetuados, em todos os grupos de amostras com o mesmo tempo de cura, varrimentos de deformação (entre 0,01 e 10%), à frequência de 1 Hz. A taxa de deformação a usar no varrimento de frequência foi determinada de forma a que o módulo conservativo ( $G'$ ) se apresente na zona linear do gráfico.

Os varrimentos de frequência foram conduzidos com um intervalo de oscilação da frequência entre 0,001 a 100 Hz. O teste foi conduzido em 3 porções diferentes resultando, assim, 3 réplicas por amostra. Os resultados obtidos no reómetro foram a variação, com a frequência, dos seguintes parâmetros: módulo conservativo ( $G'$ , em Pa), módulo dissipativo ( $G''$ , em Pa). Posteriormente obtiveram-se os espectros mecânicos ( $G'$  e  $G''$  em função da frequência) e foi determinado o valor de  $G'_{1\text{Hz}}$  (Alvarenga *et al.*, 2008).

### **Cor**

A análise instrumental de cor foi realizada com uma pistola colorimétrica Munsell CR-300® (Munsell, Osaka, Japan), de acordo com o sistema de coordenadas CIELAB:  $L^*$  corresponde à luminosidade que varia entre 0 (preto) e 100 (branco),  $a^*$  corresponde à tonalidade verde/vermelho ( $-60$  é verde e  $+60$  é vermelho) e  $b^*$  tonalidade azul/amarelo ( $-60$  é azul e  $+60$  é amarelo). As medições foram efetuadas na crosta e na pasta, depois de retirada a capa superior do queijo. Como cada amostra é composta por 5 unidades, e cada unidade foi realizada em duplicado, foram realizadas um total de 10 réplicas por amostra (Alvarenga *et al.*, 2011). Não foi possível determinar a cor para as amostras aos 49 dias, devido a uma avaria do equipamento.

### **3.3 – Tratamento Estatístico**

Como referido anteriormente, os valores médios foram obtidos a partir de 2 cubas e em cada cuba foram colhidas 2 réplicas. Assim, cada valor médio está associado a 4 repetições ( $n=4$ ). Foram também determinados os desvios padrão, erro padrão e o intervalo de confiança a 95%. Para monitorizar a evolução de cada propriedade, *per se*, ao longo da cura



e/ ou as diferenças entre coagulantes, efetuaram-se gráficos com representação das médias e de desvios padrão. Com as correlações de *Pearson* pudemos observar quais os parâmetros que maior influência tem na estrutura da pasta. A monitorização dos diferentes parâmetros em conjunto foi efetuada a partir de uma análise de componentes principais (ACP) e, na qual pudémos observar a evolução das propriedades das amostras ao longo do tempo de cura, bem como as diferenças existentes entre os diferentes coagulantes.

Para o tratamento estatístico foram usados os programas Microsoft Excel<sup>365</sup> e *STATISTICA for Windows Release 7.0 – Copyright © StatSoft, INC.*

## Capítulo 4 – Resultados

### 4.1 – Monitorização das propriedades físicas e químicas ao longo da cura

Os resultados médios e desvios padrão obtidos na caracterização física e química das amostras de queijo ao longo do tempo de cura, encontram-se nas tabelas (A-D) no apêndice I. Foi possível observar um aumento do desvio padrão para a maioria dos parâmetros analisados ao longo da cura. Isto deve-se ao facto de o queijo ser um produto que depende da atividade biológica sendo possível observar diferenciação entre amostras do mesmo lote, principalmente em períodos de cura mais avançados onde já houve tempo para um maior número de estirpes bacterianas atuarem. (Alvarenga, 2008).

O Despacho nº 29/94 de 4 de fevereiro estipula as características a que o queijo de Évora DOP deve obedecer. Este despacho indica que o teor de humidade de queijo isento de gordura (HQG) deve variar para queijos de pasta dura entre 49-56% e para pasta semidura entre 54-65%, enquanto que para o teor de gordura referido ao resíduo seco (GRS) deve variar entre 45-60% para ambos os tipos.

Na figura 3 pode-se observar a evolução dos valores médios da humidade e da humidade de queijo isento de gordura (HQG) ao longo da cura. Verifica-se uma diminuição dos valores de humidade ao longo da cura (Figura 3a). Esta diminuição é gradual, mas mais acentuada na primeira fase, até aos 35 dias de cura. Os valores de humidade do coagulante animal são sempre superiores aos valores de coagulante vegetal apesar de, no final da cura, essas diferenças se atenuarem. Em termos gerais, as amostras passam de valores médios de humidade próximos de 60% no início da cura para valores de cerca de 20% ao fim de 90 dias. Esta desidratação acentuada é justificada pelas pequenas dimensões dos queijos. Vioque *et al.*, (2000) que estudaram o comportamento da *Cynara cardunculus* L. em queijos produzidos com leite de ovelha encontraram valores médios de humidade superiores ao final dos 90 dias de cura, em concordância Fernández-Salguero *et al.*, (2003), que estudaram o comportamento de um recombinante de cipsinas em comparação com um coagulante de origem animal ao longo de 120 dias de maturação em queijos de ovelha, também obtiveram resultados superiores aos deste estudo. Valores muito superiores foram encontrados por Silva (2004) e Alvarenga (2000) que estudaram Queijo Serpa até aos 42 dias de cura. Canada (2001), que estudou o Queijo Serpa maturado, também demonstrou valores superiores aos obtidos nesta análise.

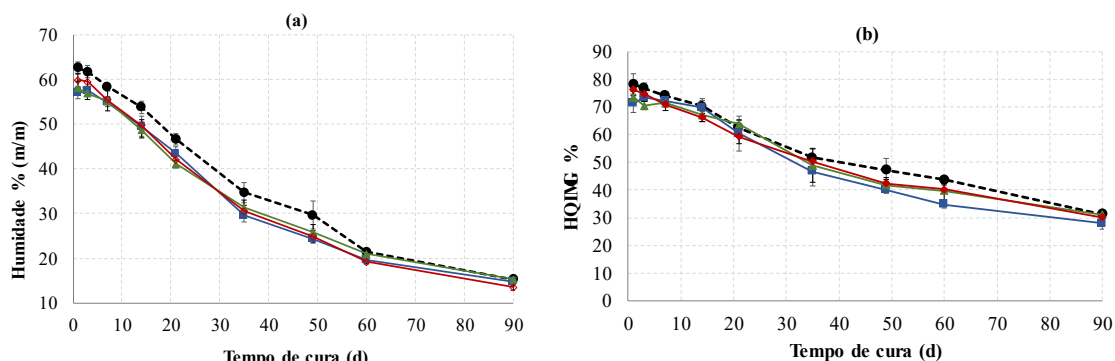


Figura 3

Figura 3 – Evolução dos valores médios de humidade (a) e de humidade no queijo isento de gordura (HQG) (b) das amostras obtidas com coagulante animal (---●---) e com os diferentes coagulantes vegetais: C1(—■—), C2 (—▲—) e C3 (—◆—). Barras de erro em Y representam o intervalo entre a média  $\pm$  desvio padrão.

Na figura 3(b), é possível observar que a HQG diminui uniformemente para todos os coagulantes. No final dos 90 dias de cura as amostras apresentaram valores médios de HQG inferiores a 49% ou seja a valores inferiores ao estipulado no diploma legal para queijos de pasta dura (Despacho nº 29/94). Observando a figura 3b e, de forma mais detalhada, os valores referentes à HQG nas diferentes tabelas do apêndice I, pode-se referir que a taxa de descida de humidade é muito acentuada dificultando o cumprimento do estipulado nos Despacho nº 29/94, ou seja, queijo de Évora de pasta dura deve ter valores de HQG entre 49-56% e de pasta semidura entre 54-65%. De notar que os valores de referência aos queijos de pasta semi-dura foram obtidos antes do período mínimo de cura destes queijos (30 dias), e os queijos de pasta dura são obtidos perto dos 35 dias, imediatamente após este período mínimo.

Os resultados sugerem uma desidratação acentuada dos queijos, não havendo tempo para os processos de maturação necessários ao desenvolvimento de características esperadas em queijos de cura mais prolongada e, em acréscimo, reduzindo o período de comercialização destes queijos de acordo com as especificações legais em vigor ou seja, o Despacho nº 29/94.

Na figura 4 pode-se observar os valores médios referentes à gordura e gordura no resíduo seco. Como foi referido anteriormente, sendo o queijo de Évora um queijo gordo (Despacho nº 29/94) os valores de GRs devem-se situar entre os 45% e os 60%. Em estudos anteriores, para queijos da região Alentejo, foram obtidos resultados semelhantes em (Alvarenga, 2000; Canada, 2001; Silva 2004; Alvarenga 2008; Alvarenga *et al.*, 2008, Alvarenga *et al.*, 2011).

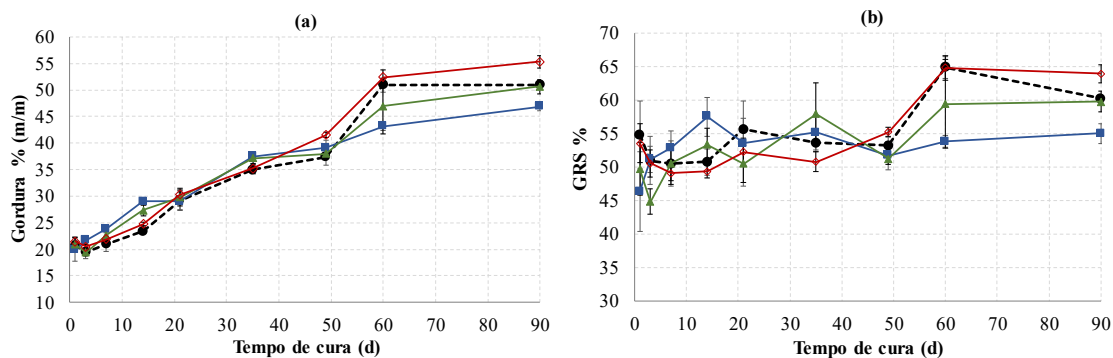


Figura 4 – Evolução dos valores médios de gordura (a) e de gordura em matéria seca presente (b) das amostras obtidas com coagulante animal (---●---) e com os diferentes coagulantes vegetais: C1 (—■—), C2 (—▲—) e C3 (—◆—). Barras de erro em Y representam o intervalo média  $\pm$  desvio padrão.

De acordo com a figura 4(b), verifica-se que os resultados obtidos para o teor de GRS apresentaram variações até aos 49 dias, podendo-se observar depois uma estabilização até ao final da cura, atingindo valores entre 55-64%. De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que estes queijos podem-se classificar como gdo ( $45\% < \text{GRS} < 60\%$ ), estando dentro dos valores estipulados no despacho nº 29/ 94.

Na figura 5 pode-se observar o comportamento do pH e da acidez ao longo da maturação. O comportamento da acidez apresenta maiores oscilações quando comparado ao pH que apresenta valores inferiores de desvio padrão. Este perfil de pH e acidez, deve-se ao desenvolvimento das bactérias acidificantes promovendo o metabolismo da lactose e conversão em ácido láctico no início da cura, bem como à utilização desse ácido láctico como substrato no final da cura provocando a subida de pH (Alvarenga *et al.*, 2008).

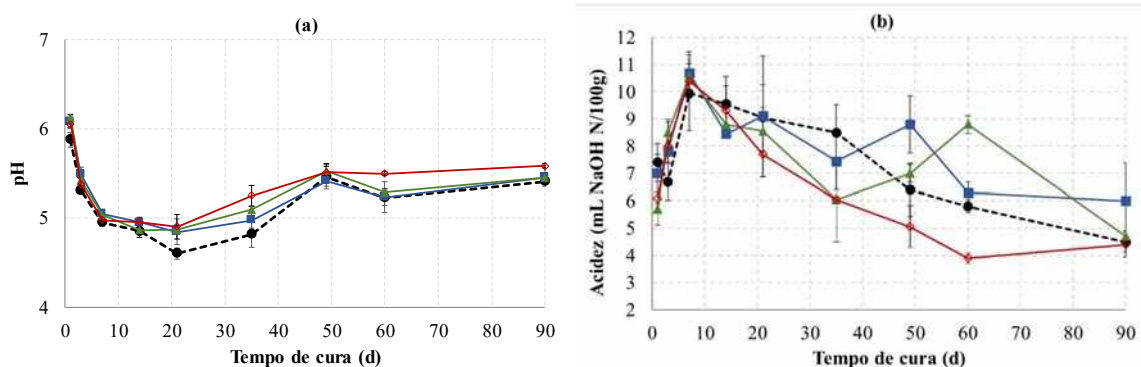


Figura 5 – Evolução dos valores médios de pH (a) e de acidez (b) das amostras obtidas com coagulante animal (---●---) e com os diferentes coagulantes vegetais: C1 (—■—), C2 (—▲—) e C3 (—◆—). Barras de erro em Y representa o intervalo média  $\pm$  desvio padrão.

Em termos genéricos, o perfil de pH é semelhante ao observado noutros estudos (Alvarenga, 2000; Canada, 2001; Pinho, 2003; Silva, 2004; Alvarenga, 2008; Alvarenga *et al.*, 2008; Alvarenga *et al.*, 2011).

Quando às frações azotadas (figura 6) verificou-se uma subida nos valores para o azoto total mais acentuada na fase inicial da cura, período em que se observou uma taxa de desidratação mais elevada (figura 6a). Os valores de Azoto total observados são semelhantes aos obtidos para tempos de cura idênticos noutros tipos de queijo (Alvarenga, 2000; Canada, 2001; Pinho, Alvarenga 2008).

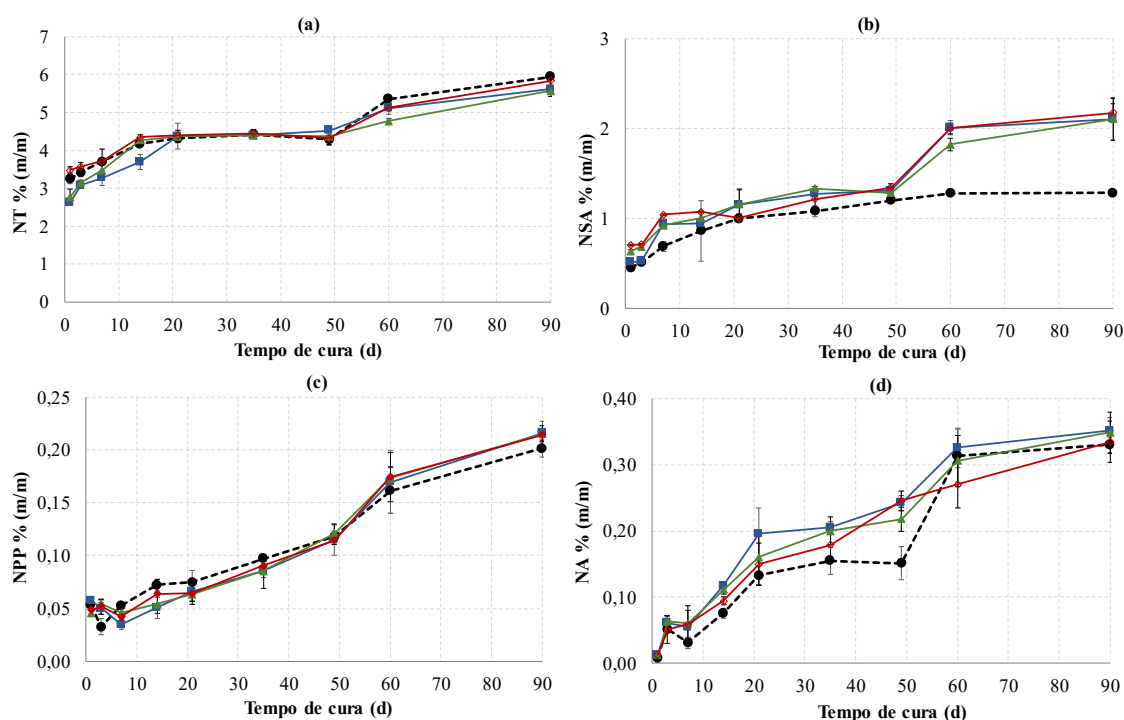


Figura 6 – Evolução dos valores médios das frações NT%( a), NSA%( b), NPP%( c), e NA%( d) das amostras obtidas com coagulante animal (---●---) e com os diferentes coagulantes vegetais: C1 (—■—), C2 (—▲—) e C3 (—◆—). Barras de erro em Y representam o intervalo média  $\pm$  desvio padrão.

Ao longo da maturação, as amostras elaboradas com coagulantes vegetais apresentaram sempre valores superiores de NSA% do que as amostras elaboradas com coagulante animal (figura 6b). Canada (2000) e Silva (2004) encontraram valores inferiores aos deste estudo. Enquanto Alvarenga (2000) encontrou valores médios superiores ao final de 42 dias (3,27-5,21%). Em relação às frações azotas não proteicas (figura 6c), observou-se alguma instabilidade inicial para todos os coagulantes, sendo que após o 7º dia estabilizaram apresentando uma evolução gradual e uniforme até ao final da cura. Já o comportamento das frações azotadas aminoacídicas (figura 6d) apresentou oscilações até aos 49 dias de cura,

sendo mais notório para o coalho que apresenta um ligeiro decréscimo entre os 35 e 49 dias. Após o 49º dia todos os coagulantes estabilizaram.

Observou-se assim que as amostras elaboradas com coagulante animal apresentam valores superiores de proteólise primária quando comparados com as amostras elaboradas com flor de cardo. A proteólise secundária foi relativamente semelhante nos dois tipos de amostra. Estes resultados estão de acordo aos obtidos por outros autores (Freitas & Milcata, 1996; Roa et al., 1999; Tejada et al., 2008; Delgado et al., 2010)

Na Figura 7 pode-se observar os texturogramas médios (perfil de textura) para as amostras de Cynara 1 com diferentes tempos de cura (1, 14, 35 e 60 dias). Optou-se pela representação apenas do “Cynara 1”, uma vez que o comportamento dos restantes é semelhante.

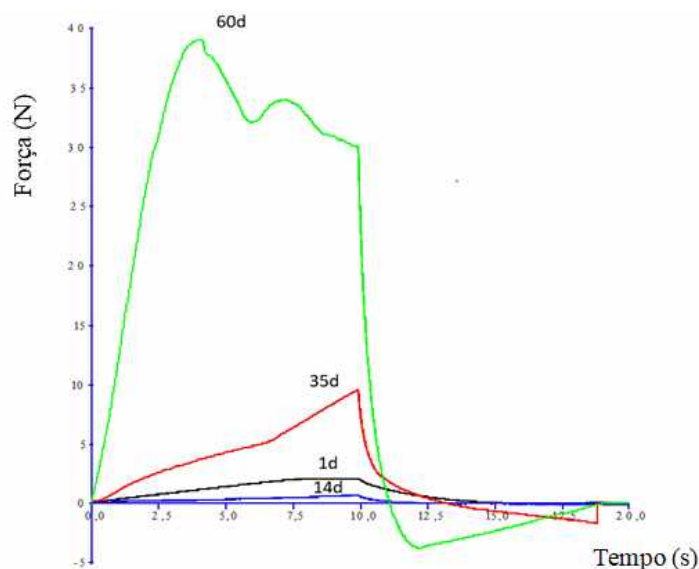


Figura 7 – Perfil de textura médio para amostras obtidas com C1 com 1, 14, 35 e 60 dias cura.

Até aos 35 dias de cura a textura apresentou-se mais macia, pelos valores inferiores de dureza e pelo perfil menos recortado, no entanto, aos 60 dias, a textura apresentou-se mais firme, pelo perfil ser mais recortado e os valores de dureza superiores. Esta observação será confirmada pelos valores médios de dureza observados na figura 10.

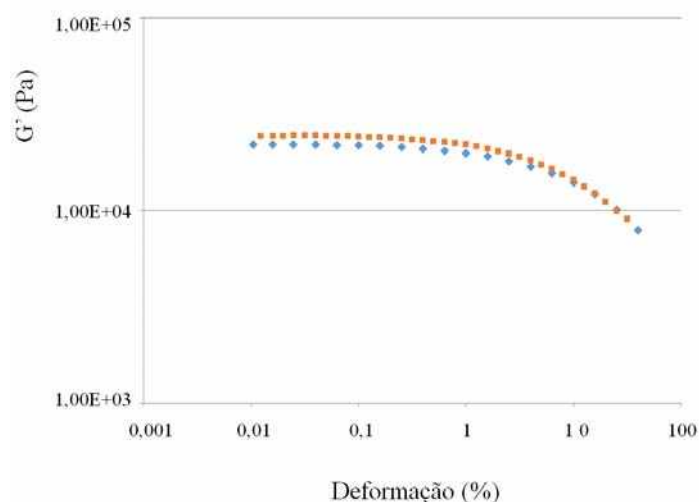


Figura 8 – Varrimentos de deformação exemplificativo à frequência de 1Hz

A análise do reômetro foi efetuada em duas fases. Na primeira fase, para determinar o limite da viscoelasticidade linear (LVE) foram efetuados, em todos os grupos de amostras com o mesmo tempo de cura, varrimentos de deformação (entre 0,01 e 10%), à frequência de 1 Hz (Figura 8). A partir desses varrimentos de deformação foram determinadas as deformações a usar nos varrimentos de frequência (2ª fase do ensaio) com garantia de trabalho no limite da viscoelasticidade linear (LVE). Os valores de deformação usados nos varrimentos de frequência dependeram do tempo de cura e podem-se observar na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de deformação (%) escolhidos a aplicar nos varrimentos de frequência em diferentes tempos de cura.

Tempo de cura (d)	Deformação escolhida (%)
1, 3	0,1
7	0,01
14, 21	0,02
35, 49 e 60	0,05

Assim, dependendo do tempo de cura, os espectros mecânicos (varrimentos de frequência) foram realizados a diferentes taxas de deformação. Os varrimentos de frequência foram conduzidos com um intervalo de oscilação da frequência entre 0,01 a 100 Hz (figura 9).

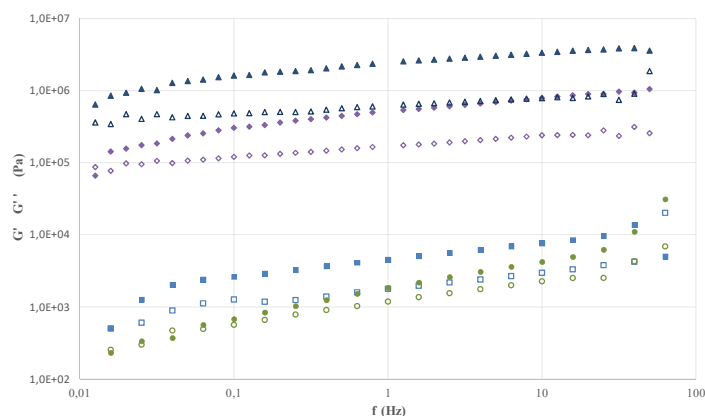


Figura 9 – Espectro mecânico exemplificativo das amostras de obtidos com coagulante C1 com 1d (■  $G'$ , □  $G''$ ), 14d (●  $G'$ , ○  $G''$ ), 35d (◆  $G'$ , ◇  $G''$ ) e 60 dias cura (▲  $G'$ , △  $G''$ ).

A evolução do comportamento reológico para os diferentes coagulantes ao longo da cura foi semelhante. Notou-se uma estrutura débil nas amostras de 1 e 14 dias devido à observação de valores de  $G''$  muito próximo de  $G'$ , elevada dependência da frequência e existência de “crossing point” para frequências baixas, ou seja, nestas frequências  $G'' > G'$ . A estrutura da amostra de 14 dias foi a que se apresentou mais fraca. As amostras com maior tempo de cura apresentaram-se mais estruturadas, ou seja, apresentaram valores de  $G'$  bastante superiores a  $G''$  em toda a gama de frequências com pouca dependência da frequência. Esta observação foi confirmada pelos valores médios de  $G'$  1Hz na figura 10.

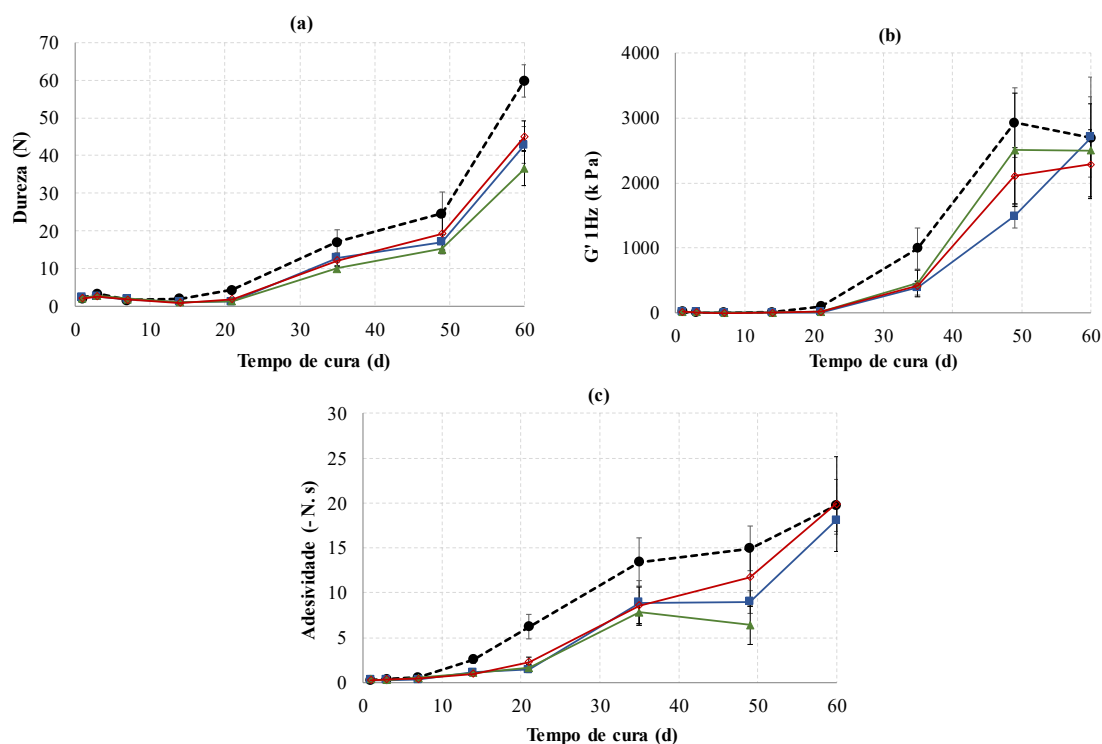


Figura 10 – Evolução dos valores médios da dureza (a), módulo conservativo (b) e adesividade (c) das amostras obtidas com coagulante animal (---●---) e com os diferentes coagulantes vegetais: C1 (—■—), C2 (—▲—) e C3 (—◆—). Barras de erro em Y representam o intervalo média  $\pm$  desvio padrão.



No primeiro dia de cura as amostras de queijo os apresentavam uma estrutura suave e débil, com uma pasta pouco elástica resultado das reações bioquímicas enzimáticas que são muito intensas no início da maturação. Como se pode verificar na figura 10 os parâmetros estruturais (dureza e  $G'$  1Hz) apresentaram um perfil semelhante, ao longo da cura, observou-se uma estrutura mais firme no caso das amostras elaboradas com coagulante animal do que nas restantes amostras.

Em relação aos parâmetros de cor (figura 12), foi possível verificar uma evolução da cor da crosta muito idêntica entre as diferentes amostras. A luminosidade inicial observada nos diferentes tipos de amostras é cerca de 90. O decréscimo acentuado dos valores da Luminosidade, depois do 7º dia, é explicado pelo escurecimento da crosta, sendo que no final da cura obtiveram-se resultados de  $L^*$  na ordem dos 60 para todos os coagulantes. Os valores obtidos para  $a^*$  evoluíram de cerca de -3 para 0 enquanto que para  $b^*$  os valores obtidos passaram de valores próximos de 10 para valores próximos de 20. Assim, ao longo da cura a crosta das amostras foi-se tornando mais escura e amarelada.

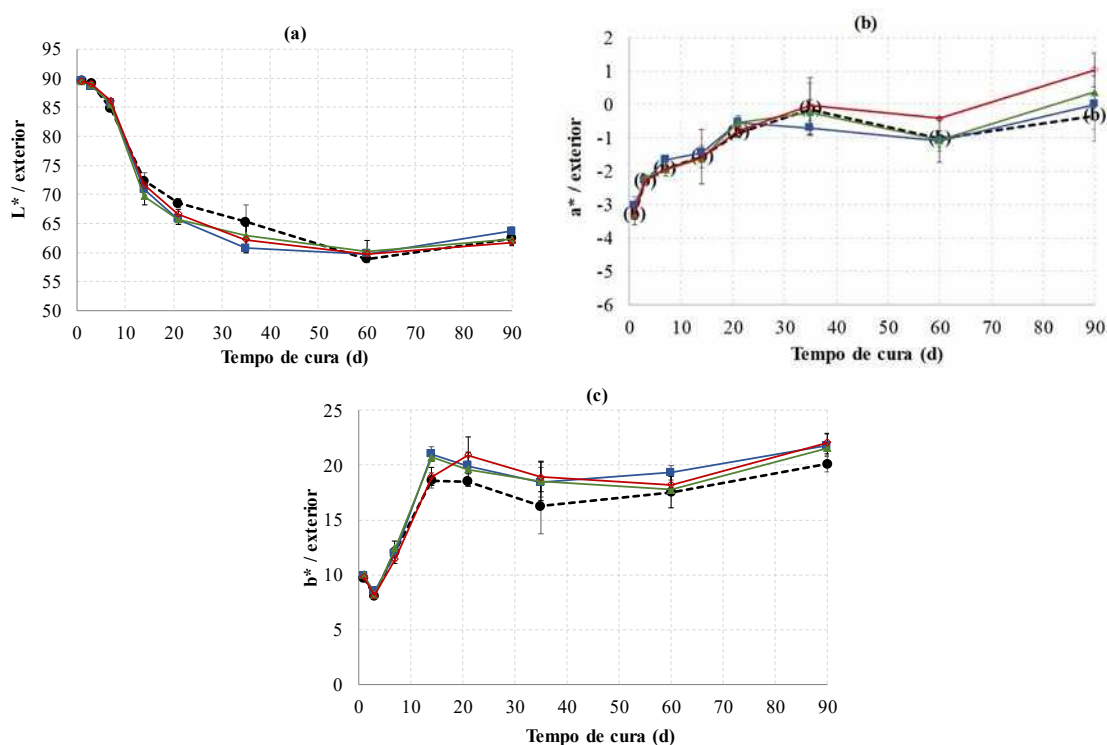


Figura 11 – Evolução dos valores médios dos parâmetros de cor exterior  $L^*$  (a),  $a^*$  (b) e  $b^*$  (c) das amostras obtidas com coagulante animal (---●---) e com os diferentes coagulantes vegetais: C1 (—■—), C2 (—▲—) e C3 (—◆—). Barras de erro em Y representam o intervalo média  $\pm$  desvio padrão.

Na figura 12 pode-se observar a evolução dos valores médios da cor no interior das amostras. A evolução do parâmetro  $L^*$  no interior foi muito semelhante à crosta. No entanto houve ligeiras diferenças em relação aos parâmetros cromáticos. Ou seja, os valores médios de  $a^*$  não subiram e, em relação aos  $b^*$  observou-se uma flutuação à volta dos 10-15. Pode-se concluir que o interior perdeu o brilho, mas não ficou tão amarelo como a crosta.

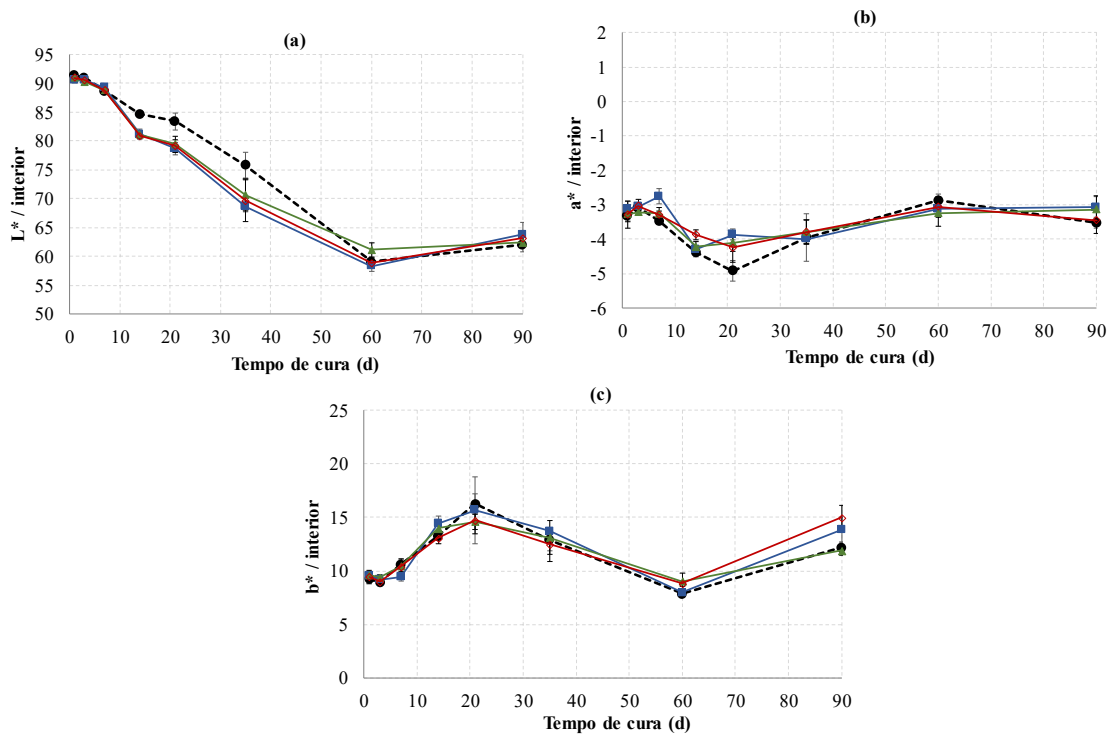


Figura 12 – Evolução dos valores médios dos parâmetros de cor interior  $L^*$  (a),  $a^*$  (b) e  $b^*$  (c) das amostras obtidas com coagulante animal (---●---) e com os diferentes coagulantes vegetais: C1 (—■—), C2 (—▲—) e C3 (—◆—). Barras de erro em Y representam o intervalo média  $\pm$  desvio padrão.

## 4. 2 – Correlações de Pearson

A partir da informação obtida na figura 10, podemos reforçar a hipótese que este tipo de queijo apresenta uma estrutura cada vez mais firme ao longo da cura. Observando os gráficos da figura 3, 5 e 6, deve ser levantada a hipótese que a perda de água é o acontecimento que tem maior influência na evolução da textura do queijo de Évora, ao contrário do que acontece com outros queijos, como o Serpa, em que o efeito da proteólise e da queda do pH prevalecem (Alvarenga *et al.*, 2008). Para apoiar esta hipótese, determinaram-se as correlações de Pearson, e o nível de significância, entre os indicadores

estruturais (dureza e módulo conservativo), os indicadores de proteólise (NP% e NA%), o pH e a humidade (Tabela 4).

Tabela 5 – Resultados das correlações (r) e valores de significância (P) entre o módulo conservativo e a dureza em relação à humidade, ao pH, à acidez, e aos indicadores de proteólise (NP% e NA%).

	Módulo conservativo (Pa)		Dureza (N)	
	r	P	r	P
Humidade %(m/ m)	-0,819	0,000	-0,797	0,000
NP%	0,859	0,000	0,874	0,000
NA%	0,739	0,000	0,878	0,004
pH	0,048	0,614	0,044	0,648

O módulo conservativo e a dureza apresentaram valores de correlações significativas com todos os parâmetros apresentados, exceto o pH ( $P > 0,05$ ). A correlação entre a humidade e os parâmetros estruturais é significativa ( $P < 0,05$ ) e negativa. Isto significa que a diminuição da humidade do queijo implica aumento da firmeza. Este acontecimento é explicado pelo facto de as moléculas de água funcionarem como lubrificantes da rede proteica e a diminuição da humidade dificulta a mobilidade das moléculas tornando a rede proteica cada vez mais estruturada e firme.

Em relação às frações azotadas, para estas terem influência na estrutura do queijo, esperava-se uma correlação negativa com os indicadores estruturais. Ou seja, à medida que as frações azotadas aumentavam, devia-se observar uma estrutura menos firme, à semelhança do que se observou para outro tipo de queijos (Alvarenga *et al.*, 2008). Como a correlação é positiva significa que com o incremento das índices de proteólise a estrutura torna-se mais firme. Não sendo esta observação a esperada, podemos deduzir que a perda de peso é o evento que mais importância tem no comportamento estrutural do queijo de Évora.

#### 4.3 – Análise em componentes principais

Para avaliar os efeitos do “tempo de cura” e “tipo de coagulante” nas propriedades das amostras foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP). Nesta análise foram usados 12 atributos: dureza (N), G 1Hz, cor interior ( $L^*a^*b^*$ ), pH, gordura, NT,

NSA/ NT%, NP/ NT%, NA/ NT% e humidade. Na tabela 6 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais obtidos na análise efetuada.

Tabela 6– Valores próprios e extração dos componentes principais das diferentes amostras.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância acumulada (%)
1	7,42	61,80	7,42	61,80
2	2,82	23,51	10,24	85,31
3	0,55	4,56	10,78	89,86
4	0,48	4,03	11,27	93,89
5	0,22	1,84	11,47	95,73
6	0,17	1,40	11,66	97,13
7	0,10	0,86	11,76	97,99
8	0,08	0,70	11,84	98,69
9	0,08	0,65	11,92	99,34
10	0,04	0,29	11,96	99,63
11	0,03	0,22	11,98	99,85
12	0,02	0,15	12,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 85,3% da variância: 61,8% para o primeiro componente e 23,5% para o segundo. Só foram significativos os dois primeiros componentes, uma vez que só estes apresentaram valor próprio superior a 1. Estando em análise 12 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 12 atributos foram transformados em 12 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por terem valor próprio superior a 1, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro tem valor próprio de 7,42 (CP1) e o segundo com valor próprio 2,82 (CP2).

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e as componentes principais (tabela 7).

Tabela 7 – Coeficientes de correlação entre os valores dos atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
Dureza (N)	-0,91*	-0,31
G 1Hz	-0,91*	-0,305
L*	0,97*	-0,11
a*	-0,06	-0,89*
b*	0,10	0,94*
pH	0,19	-0,82*
Gordura	-0,97*	0,05
NT	-0,86*	0,37
NSA/ NT%	-0,77*	0,06
NNP/ NT%	-0,85*	-0,29
NA/ NT%	-0,91*	0,18
Humidade	0,97*	-0,11

\* - correlações significativas ( $r > 0,7$ ).

Os resultados da análise mostraram que o componente principal CP1 foi explicado, com maior peso, pela dureza, módulo conservativo, gordura, azoto total e frações azotadas (NSA/ NT%, NNP/ NT%, NA/ NT%) (com valores de correlação negativos) e pela humidade e cor da pasta L\* (com valor de correlação positivo). O componente principal CP2 foi explicado pelo pH e cor da pasta a\* (com valor de correlação negativos) e pela cor da pasta b\* (com valores de correlação positivos) (figura 13).

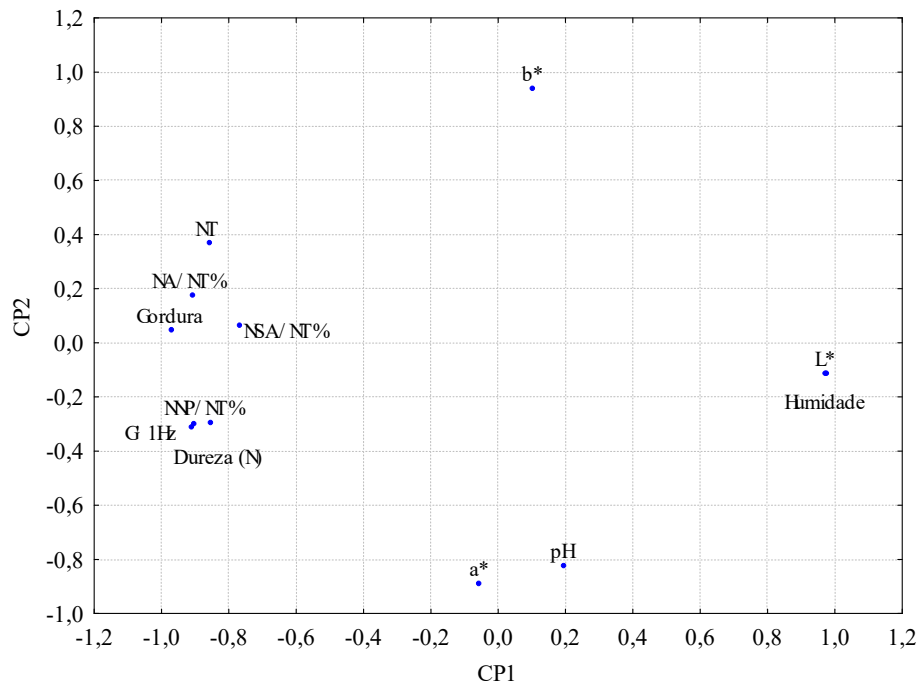


Figura 13 – Distribuição dos atributos no plano principal.

Destaca-se que o CP1 foi justificado pelos parâmetros reológicos, azotes e luminosidade enquanto que o CP2 é justificado pelo pH e pelos parâmetros cromatúricos de cor. Na figura 14 podemos observar a projeção das amostras no plano principal, constituído pelos dois primeiros componentes principais bem como os atributos que justificam cada eixo.

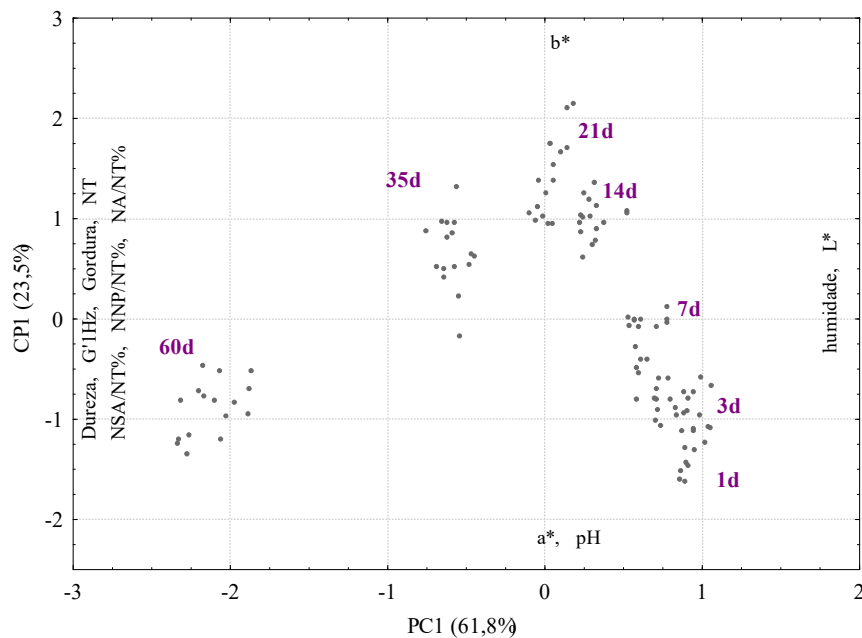


Figura 14 – Projeção das amostras no plano principal

Pela análise de distribuição dos pontos consegue-se observar uma separação das amostras no plano de acordo com o tempo de cura. Ao longo da cura, podemos observar que as amostras evoluem do quadrante com valores elevados de pH,  $a^*$ , humidade e  $L^*$  (1, 3 e 7

dias), para o quadrante com pH baixo e  $b^*$  alto (14, 21 e 35 dias) e, por fim, para o quadrante onde a firmeza da textura e os índices de proteólise são elevados enquanto a humidade e a cor  $L^*$  é baixo (60 dias de cura).

Para avaliar se existe influência do coagulante nas propriedades em estudo, a projeção das amostras foi “ampliada” para diferentes tempos de cura (figura 15).

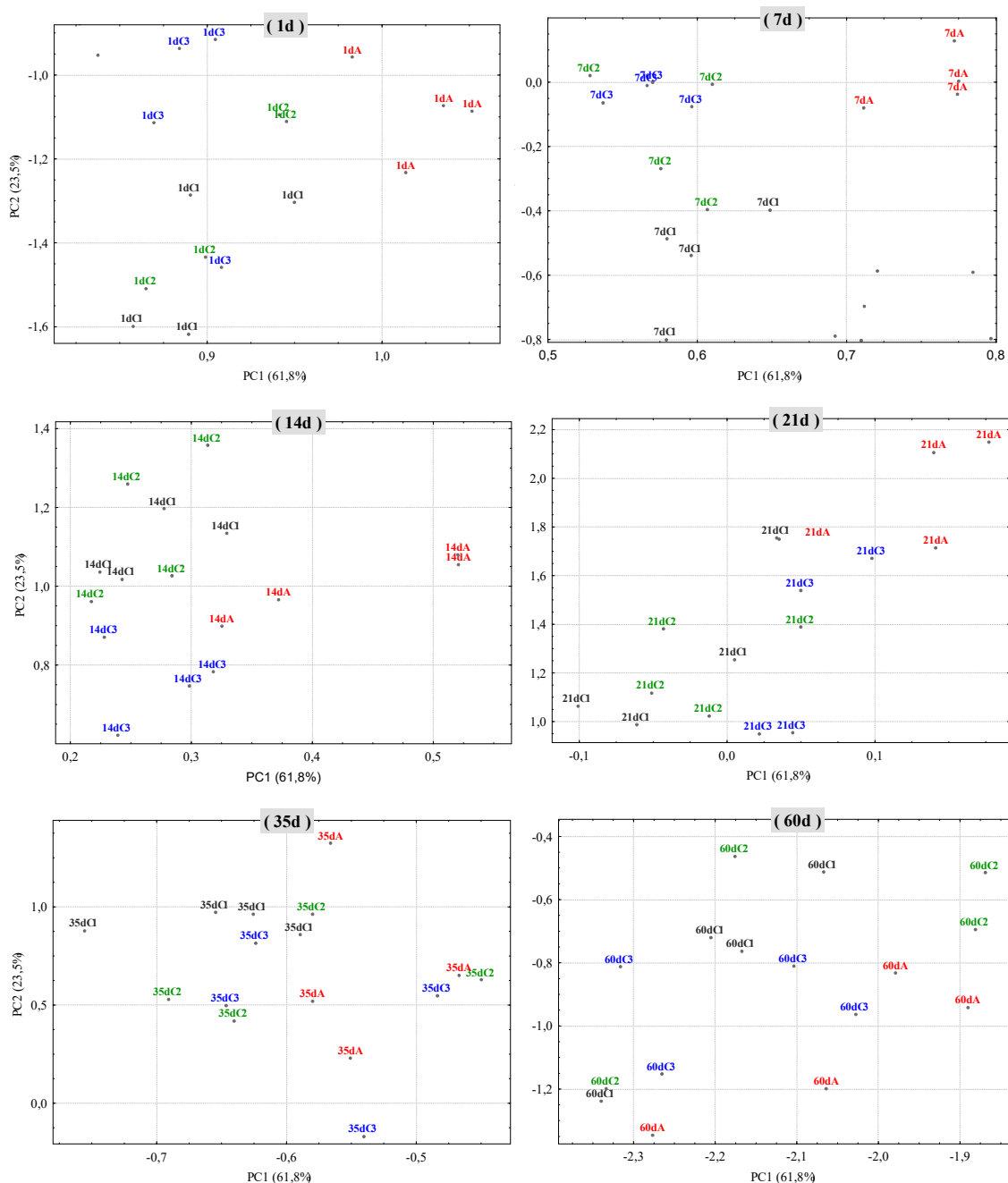


Figura 15 – Proj eção das amostras dos diferentes coagulantes *Cynara* 1 (C1), *Cynara* 2 (C2), *Cynara* 3 (C3) e coagulante animal (A) para diferentes tempos de cura (1d, 7d, 14d, 21d, 35d e 60d).

Como se pode observar, nos primeiros dias de cura, as amostras elaboradas com coagulante animal encontram-se separadas das amostras elaboradas com flor-de-cardo, das diferentes populações em estudo. Comportamento semelhante foi observado por Fernández-Salguero *et al.* (2003) em queijo tipo-Manchego. Nestes primeiros dias de cura, também se observou algum agrupamento, menos evidente, das amostras elaboradas com coagulante vegetal. Quase não se observou influência do coagulante (animal vs vegetal) nas propriedades estudadas e, além disso, também se observou alguma influência, mas mais ligeira, das diferentes populações de cardo em estudo.

Esta tendência vai-se suavizando ao longo da cura. No final da cura, as amostras com 35 e 60 dias produzidas com coagulante animal, estão misturadas no plano principal, com as amostras produzidas com coagulante vegetal, significando que a influência do coagulante que se observou nos períodos iniciais da maturação, deixou de se observar no final da cura. Este facto permitiu-nos concluir que no início da cura, as propriedades físico-químicas e reológicas são influenciadas pelo agente coagulante mas, à medida que a dinâmica de cura foi avançando, outros agentes foram tendo mais preponderância nestas propriedades como as enzimas produzidas pelos microrganismos responsáveis pela cura.



## Capítulo 5 – Conclusões

No presente trabalho realizou-se o estudo da evolução ao longo da cura, das propriedades físico e químicas de queijo elaborado com a tecnologia de processamento de queijo de Évora a partir de flor de cardo recolhido em três diferentes populações do Alentejo e coagulante animal. Pretendeu-se assim contribuir para a avaliar a importância do impacto da variabilidade genética da flor do cardo nas propriedades dos queijos.

Após uma análise e discussão dos resultados, é possível destacar algumas conclusões:

- Os resultados sugeriram uma taxa de desidratação acentuada das amostras, não havendo tempo para obter queijos de pasta semidura com pelo menos 30 dias de cura e os queijos de pasta dura obtiveram-se com 35 dias de cura (em vez dos 90 previstos na legislação). A partir dos 49 dias de cura os valores de humidade referida ao queijo isento de gordura eram inferiores a 49% (característico de queijos extra-duros), causando perdas desnecessárias de peso (e rendimento) e o produto não pode ser classificado como queijo de Évora (Despacho nº 29/94). Sabendo que o ensaio foi realizado em ambiente fabril deve-se introduzir as alterações necessárias para que a cura seja mais lenta e suave, podendo obter-se os diferentes queijos previstos no despacho, ou seja queijos semiduros (entre 30 e 90 dias de cura) e duros (com mais de 90 dias de cura).
- As amostras obtidas com coagulante animal apresentaram, ao longo da cura, valores superiores de humidade, sendo esta observação mais marcante nos períodos iniciais.
- As amostras de queijo produzidas com os coagulantes vegetais apresentaram maior atividade proteolítica primária quando comparadas com as amostras obtidas com coagulante animal.
- As amostras obtidas com coagulante animal apresentaram-se, de um modo geral, mais firmes do que as amostras elaboradas com flor de cardo. Entre estas não se observou grande variabilidade.
- A perda de peso foi o evento com maior influência na estrutura e textura do queijo de Évora.
- No início da cura, as propriedades físico-químicas e reológicas foram influenciadas pelo agente coagulante mas, à medida que a dinâmica de cura foi avançando, outros agentes apresentaram maior preponderância nestas propriedades, como as enzimas

produzidas pelos microrganismos responsáveis pela cura. As diferenças observadas no período inicial da cura também se refletiram, embora em menor grau, ao nível dos diferentes coagulantes de origem vegetal

- De forma geral pode-se concluir que a influência da diversidade genética da flor de cardo nas propriedades físico-químicas do queijo de Évora é muito ligeira.

## Referências bibliográficas

- Alais, C. (1985). *Ciencia de la Leche - Principios de técnica lechera*, Editorial Reverté, S.A., Barcelona.
- Alvarenga, N B. MG (2000). *Estudos em Textura de Queijo Serpa*”. Dissertação para obtenção do grau de Mestre, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Alvarenga, N B. MG (2008) - *Introdução da tecnologia de congelação na produção de queijo de ovelha*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Alvarenga, N, Silva, P., RodriguezGarcia J. &Sousa, I. (2008) . Changes in chemical, physical and rheological properties of Serpa cheese during the ripening. *Journal of Dairy Research*, **75** (2), pp. 233-239.
- Alvarenga, N, Canada, J. &Sousa, I. (2011) Effect of freezing on the rheological and chemical properties of rawewe's milk semisoft cheese. *Journal of Dairy Research*, **78**, pp. 80-87.
- AOAC (1990a). Method no. 920.124. In *Official Methods of Analysis*, 15ª edição. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- AOAC (1990b). Method no. 926.08. In *Official Methods of Analysis*, 15ª edição. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- AOAC (1990c). Method no. 955.30. In *Official Methods of Analysis*, 15ª edição. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- APN- Associação Portuguesa dos Nutricionista (2014). *Dieta Mediterrânea – um padrão de alimentação saudável*. [E-book nº 34]. Disponível em: [http://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/Ebook\\_Dieta\\_Mediterranea.pdf](http://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/Ebook_Dieta_Mediterranea.pdf)
- Brás, T., Parreira, P., Paulino, A., Ferro, A., Fernandes, M, Alvarenga, NB., Dias, J., Carvalho, MJ., Portugal, J., Ramôa, S., Nôzes, P., Lage, P.C., Costa, I., Regato, M, Belo, A.T., Louro, A.P., Gomes, S.F., Caloto, E.D., Cruz, C.P., Pinheiro, C., Lamy, E., Machado, G, Simões, P., Belo, A.D.F., Barros, M, Rosa, N, Barracosa, P., Silvestre, A.J.D., Neves, L.A., Crespo, J.G &Duarte, MF. (2016). Cardo. Um recurso endógeno de elevado valor acrescentado. In *Voz do Campo*, Agrociência.

- Brule, G e Lenoir, J. (1987). A coagulação do leite. In “*O queijo*” (C. EuroAgro, ed.), Vol. 1 Publicações Europa-América, Mem Martins.
- Canada, J.S.B. (2001). *Caracterização sensorial y físico-química del queso de Serpa*. Tese de Doutoramento, Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Conceição, C., Martins P., Alva renga, N, Dias, J., Garrido, E , Gomes S., Freitas S., Belo, A., Brás, T., Paulino A. & Duarte M (2018). *Cynara cardunculus*: use in cheesemaking and pharmaceutical applications. In *Technological approaches for novel applications in dairy processing* (Nurcan Koca Ed.), Chapter 5, pp 73-107, Intechopen Academic Editors.
- Correia, P., Vitor, A., Tenreiro, M, Correia, A. C., Madanelo, J., & Guiné, R. (2016). Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese. *Nutrition & Food Science*, **46**(4), pp. 458–475.
- Delgado F.J, Rodríguez-Pinilla, J., González-Crespo, J., Ramírez, R. & Roa, I. (2010) Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese (‘Torta del Casar’) manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*. **45**, pp. 512-519.
- Despacho nº 29/ 94 de 4 de Fevereiro(1994) – estabelece as especificações do queijo de Évora DQP. Disponível em:  
[https://tradicional.dgadr.gov.pt/images/prod\\_imagens/queijos/desp\\_29\\_94.pdf](https://tradicional.dgadr.gov.pt/images/prod_imagens/queijos/desp_29_94.pdf)
- Dumais, R., Blais, J. A. & Conrad, F. (1991). Queso. In *Ciencia y Tecnología de la Leche - Principios y Aplicaciones*, Vol. 2 pp. 249-266. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.
- Fernández-Salguero, J. & Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese. *Food Chemistry*, **64**, pp. 177-183.
- Fernández-Salguero, J., Prados, F., Calixto, F., Vioque, M, Sampaio, P. & Tejada, L. (2003). Use of recombinant cyprosin in the manufacture of ewe's milk cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, pp. 7426-7430.
- Freitas, A., C. & Milcata, F.X (1996). Influence of milk type, coagulant, salting procedure and ripening time on the final characteristics of piante cheese. *International Dairy Journal*. **6**, pp. 1099-1116.

- Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H & Wallace, J. (1999). Cheese: an overview In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1 pp. 389-438. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.
- Calán, E, Cabezas, L. & Fernández-Salguero, J. (2012). Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof *International Dairy Journal*. **25**, pp. 92-96.
- Gaya, P., Sánchez, C., Niñez, M & Fernández-García, E. (2005). Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. Seasonal variation. *Journal of Dairy Research* **72**, pp. 287-295.
- Gomes, S., Belo, A., Alvarenga, N, Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., Pinto-Cruz, C., Brás, T., Duarte, M & Martins, A. (2019). Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking *International Dairy Journal*, **91**, pp. 178-184.
- Guiné, R., Correia, P., & Correia, A. (2015). Avaliação Comparativa de Queijos Portugueses de Cabra e Ovelha. *Millenium*, **49**, pp. 111-130.
- ISO 3432 (1975). *Cheese - Determination of Fat Content - Butyrometer for Van Gulik Method*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kuchroo, C. N & Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* **37**, pp. 331-335.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K. & Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* **70**, pp. 1748-1760.
- Medo, A. C., Costa, M L. & Mílata, F. X (1996). Assessment of proteolysis and lipolysis in Serra cheese: effect of axial cheese location, ripening time and lactation season. *Lait* **76**, pp. 363-370.
- Martins, A. P. L. (1989). O leite de ovelha - produção, utilização e características. Contribuição para o estudo do leite de ovelha da Região de Azeitão, ENTPA - IN A, Lisboa.
- Martins, A.P.L. & Vasconcelos, M (2003). A qualidade do queijo fabricado com leite cru. Efeito dos principais factores tecnológicos. In *Pastagens e Forragens*, **24/25**, pp. 15-33.

- Martins, A. P. L., (2006). *O papel do cardo na tecnologia tradicional de fabrico de queijo. Efeito dos principais factores tecnológicos*. Instituto Superior de Agronomia. Comunicação apresentada em Portalegre no âmbito do Projecto Leader+ “Cardum”.
- Miles, M (2005). *Ecology: Concepts and Applications*. 3ª Edição, The McGraw-Hill Companies. Nova Iorque.
- Monteiro, S. MR. (1998) – *Produção de queijo Serpa. Condições de cura, armazenagem e de expedição a controlar, tendo em vista a respectiva otimização*. Relatório de estágio, Instituto Politécnico de Beja, Beja.
- More, S. (1968). Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *Journal of Biological Chemistry* **243**, pp. 6281-6283.
- NP 2105 (1983). *Queijos. Determinação do Teor de Matéria Gorda. Técnica de Van Gulik*. Instituto dos Mercados Agrícolas e da Indústria Agro-Alimentar, Lisboa.
- Ordiales, E., Benito, M.J., Martín, A., Fernández, M, Hernández, A., & Córdoba, M.D. G (2013). Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet fouse in the elaboration of “Torta del Casar” cheese *Journal of Dairy Research*, **80**, pp. 429–438.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M.J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S. & Córdoba, M de G (2012). Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus* L.) used in “Torta del Casar.” *Food Chemistry*, **133**, pp. 227-235.
- Park, Y., Juárez, M, Ramos M & Henlein, G (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *In Small Ruminant Research* **68**, pp. 88–113
- Paula, J., Carvalho A. & Furtado M (2009). Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. Revista do Instituto de Lactícios “Cândido Tostes”, Mar/ Jun, nº 367/ 368, **64**, pp. 19-25.
- Pinho, Q MC. (2003). *Implementação de metodologias analíticas com reduzido impacto ambiental para análise de queijo de ovelha – Contribuição na caracterização do Queijo Terrincho*. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor, Universidade do Porto, Porto
- Pires, E., Faro, C., Macedo, I., Esteves, C., Morgado, J., Veríssimo, P. & Dia-Pereira, GD. (1994). Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química. **54**, pp. 66-68.

- Raksakulthai, R., Rosenberg, M & Hard, N F. (2002). Accelerated cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *Journal of Food Science* **67**, pp. 923-929.
- Regulamento 1107/ 96 de 12 de junho de 1996 - relativo ao registro das indicações geográficas e denominações de origem. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, Nº L 148/ 1.
- Roa, I., Belén-López, M & Javier, F. (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*. **32**, pp. 413-419.
- Roseiro, L. B., Barbosa, M, Ames, J. M, & Wilbey, R. A. (2003 ). Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, **56** (2), pp. 76–85.
- Rosenberg, M, Wng, Z, Chuang, S. L. & Shoemaker, C. F. (1995 ). Viscoelastic property changes in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Food Science* **60**, pp. 640-644.
- Sarmiento, A. C., Lopes, H, Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samy n, B., Sergeant, K & Barros, MT. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L.* in *Planta*, **230**(2), pp. 429-439.
- Silva, ML C. d. (2001). *Estudo da maturação em queijo São Jorge: Caracterização do Perfil Proteolítico*. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Silva, P. A. M(2004). *Evolução das propriedades físico-químicas de queijo Serpa ao longo da cura*. Relatório de projeto de final de curso, Instituto Politécnico de Beja, Beja.
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J.M, Martínez-Cacha, A. & Fernández-Salguero, J. (2008). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*. **18**, pp. 139-146.
- Van Hooijdonk, A. C. M & Van Den Berg, G (1988). Control and determination of the curd-setting during cheesemaking. *International Dairy Federation*. IDF Bulletin, nº 225, pp. 1-10.

Vioque, M, Gómez, R., Sánchez, E., Mita, C., Tejada, L. & Fernández-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, pp. 451-456.



## **Apêndice I**

Médias e desvios padrão dos resultados obtidos na caracterização física e química das amostras de queijo ao longo do tempo de maturação.

Tabela A. Resultados médios e desvios-padrão obtidos para o *Cynara* 1 ao longo do tempo de cura.

Parâmetros	Tempo de cura (dias)								
	1	3	7	14	21	35	49	60	90
<b>Dureza</b>	2,44 (0,16)	2,66 (0,09)	1,98 (0,17)	1,31 (0,05)	1,39 (0,14)	12,99 (1,22)	17,09 (1,93)	42,92 (4,89)	
<b>Adesividade</b>	0,27 (0,02)	0,28 (0,05)	0,30 (0,03)	1,13 (0,26)	1,42 (0,34)	8,89 (2,50)	8,98 (1,29)	18,10 (1,62)	
<b>G' <sub>1Hz</sub> (kPa)</b>	22,69 (3,20)	12,74 (1,04)	4,53 (0,63)	7,26 (0,70)	12,11 (1,57)	387,42 (108,10)	1486,82 (183,73)	2706,33 (621,93)	
<b>Gordura (g/100g)</b>	19,88 (2,17)	21,75 (0,68)	23,81 (0,63)	29,00 (0,54)	29,00 (1,63)	37,50 (0,68)	39,06 (1,48)	43,22 (0,77)	46,88 (0,81)
<b>GRS %</b>	46,32 (5,98)	51,16 (1,97)	52,84 (2,51)	57,49 (2,85)	53,51 (6,32)	55,14 (2,58)	51,68 (2,08)	53,82 (0,90)	55,02 (1,46)
<b>Humidade</b>	56,20 (1,38)	57,47 (0,93)	54,90 (0,99)	49,48 (2,22)	43,46 (1,51)	29,57 (1,40)	24,40 (0,27)	19,69 (0,64)	14,79 (0,94)
<b>HQIG</b>	71,19 (3,22)	73,45 (1,38)	72,07 (1,88)	69,70 (3,23)	64,18 (6,29)	50,98 (5,30)	40,07 (1,30)	34,68 (1,06)	27,86 (2,11)
<b>NT %</b>	2,64 (0,08)	3,08 (0,04)	3,28 (0,20)	3,69 (0,20)	4,37 (0,34)	4,39 (0,07)	4,53 (0,05)	5,11 (0,16)	5,61 (0,12)
<b>NSA %</b>	0,51 (0,01)	0,53 (0,00)	0,94 (0,03)	0,95 (0,01)	1,16 (0,16)	1,27 (0,05)	1,31 (0,03)	2,01 (0,08)	2,11 (0,24)
<b>NSA/NT %</b>	19,53 (0,73)	17,27 (0,20)	28,78 (2,28)	25,64 (1,41)	26,41 (3,00)	28,99 (0,93)	28,92 (0,47)	39,25 (1,38)	37,59 (4,62)
<b>NNP %</b>	0,06 (0,00)	0,05 (0,01)	0,03 (0,00)	0,05 (0,01)	0,07 (0,01)	0,09 (0,01)	0,11 (0,01)	0,17 (0,03)	0,22 (0,01)
<b>NNP/NT %</b>	2,18 (0,05)	1,62 (0,16)	1,05 (0,09)	1,38 (0,32)	1,52 (0,27)	1,96 (0,14)	2,54 (0,29)	3,32 (0,56)	3,86 (0,26)
<b>NA (mg Leu/g)</b>	0,01 (0,01)	0,06 (0,01)	0,06 (0,01)	0,12 (0,00)	0,20 (0,04)	0,21 (0,01)	0,24 (0,01)	0,33 (0,03)	0,35 (0,02)
<b>NA/NT %</b>	0,50 (0,24)	1,97 (0,32)	1,69 (0,26)	3,19 (0,22)	4,53 (1,11)	4,67 (0,26)	5,35 (0,22)	6,39 (0,68)	6,27 (0,37)
<b>Acidez</b>	7,00 (0,69)	7,80 (1,19)	10,70 (0,77)	8,45 (0,10)	9,10 (2,23)	7,45 (1,04)	8,80 (1,06)	6,30 (0,38)	6,00 (1,39)
<b>pH</b>	6,07 (0,07)	5,49 (0,08)	5,05 (0,02)	4,95 (0,04)	4,84 (0,14)	4,97 (0,09)	5,42 (0,07)	5,23 (0,17)	5,46 (0,10)
<b>L</b>	89,51 (0,26)	88,58 (0,17)	85,71 (0,45)	70,82 (0,96)	65,73 (0,60)	60,69 (0,61)		59,71 (0,41)	63,62 (0,82)
<b>a</b>	-3,02 (0,27)	-2,30 (0,07)	-1,66 (0,10)	-1,45 (0,10)	-0,55 (0,12)	-0,71 (0,24)		-1,09 (0,31)	0,01 (1,11)
<b>b</b>	9,88 (0,20)	8,50 (0,06)	11,91 (0,60)	20,99 (0,64)	19,92 (0,45)	18,43 (1,38)		19,31 (0,64)	21,78 (0,99)
<b>L interior</b>	90,47 (0,35)	90,53 (0,24)	89,28 (0,19)	81,18 (0,90)	78,68 (1,05)	68,63 (0,87)		58,31 (0,94)	63,78 (2,15)
<b>a interior</b>	-3,12 (0,24)	-3,05 (0,06)	-2,76 (0,22)	-4,29 (0,04)	-3,86 (0,16)	-4,00 (0,13)		-3,12 (0,16)	-3,07 (0,31)
<b>b interior</b>	9,58 (0,05)	9,19 (0,24)	9,47 (0,42)	14,45 (0,68)	15,69 (3,11)	13,73 (0,32)		7,99 (0,28)	13,86 (1,17)

Tabela B. Resultados médios e desvios-padrão obtidos para o *Cynara 2* ao longo do tempo de cura.

Parâmetros	Tempo de cura (dias)								
	1	3	7	14	21	35	49	60	90
<b>Dureza</b>	2,34 (0,11)	2,92 (0,17)	2,15 (0,27)	1,23 (0,16)	1,54 (0,42)	10,11 (0,65)	15,24 (1,29)	36,64 (4,69)	
<b>Adesividade</b>	0,34 (0,05)	0,27 (0,01)	0,50 (0,11)	1,06 (0,31)	1,65 (0,32)	7,82 (1,43)	6,38 (2,12)		
<b>G'1Hz (kPa)</b>	21,24 (0,60)	13,13 (2,85)	4,28 (0,44)	9,39 (1,86)	19,18 (10,60)	461,24 (206,38)	2507,46 (873,97)	2500,04 (713,66)	
<b>Gordura (g/100g)</b>	20,88 (1,38)	19,38 (0,63)	22,63 (0,75)	27,31 (1,03)	29,75 (1,67)	37,13 (1,18)	38,00 (0,82)	46,97 (5,17)	50,63 (1,30)
<b>GRS %</b>	49,75 (3,89)	44,85 (1,88)	50,58 (2,58)	53,30 (2,55)	50,47 (2,80)	57,89 (4,59)	51,25 (0,90)	59,41 (6,62)	59,77 (1,54)
<b>Humidade</b>	57,99 (1,54)	56,78 (1,18)	55,21 (2,17)	48,72 (1,73)	41,05 (0,78)	31,30 (1,81)	25,85 (1,60)	20,93 (0,54)	15,30 (0,64)
<b>HQIG</b>	73,31 (2,45)	70,42 (1,54)	71,35 (2,73)	67,03 (2,47)	58,45 (1,63)	56,82 (6,13)\	41,68 (2,25)	39,77 (4,23)	31,00 (1,43)
<b>NT %</b>	2,78 (0,20)	3,15 (0,06)	3,48 (0,13)	4,27 (0,02)	4,38 (0,16)	4,39 (0,03)	4,36 (0,13)	4,77 (0,06)	5,57 (0,14)
<b>NSA %</b>	0,64 (0,01)	0,69 (0,01)	0,92 (0,00)	1,01 (0,07)	1,16 (0,17)	1,33 (0,03)	1,29 (0,03)	1,82 (0,07)	2,10 (0,23)
<b>NSA/NT %</b>	23,15 (1,58)	21,89 (0,41)	26,61 (1,01)	23,70 (1,74)	26,60 (4,73)	30,36 (0,88)	29,51 (0,29)	38,23 (1,53)	35,78 (7,67)
<b>NNP %</b>	0,05 (0,00)	0,05 (0,00)	0,05 (0,00)	0,05 (0,01)	0,06 (0,01)	0,09 (0,02)	0,12 (0,01)	0,17 (0,01)	0,22 (0,01)
<b>NNP/NT %</b>	1,65 (0,19)	1,73 (0,12)	1,33 (0,08)	1,26 (0,21)	1,44 (0,11)	1,95 (0,37)	2,78 (0,25)	3,64 (0,20)	3,87 (0,10)
<b>NA (mg Leu/g)</b>	0,01 (0,00)	0,06 (0,01)	0,06 (0,03)	0,11 (0,01)	0,16 (0,04)	0,20 (0,02)	0,22 (0,02)	0,31 (0,04)	0,35 (0,03)
<b>NA/NT %</b>	0,44 (0,07)	2,02 (0,23)	1,74 (0,78)	2,61 (0,16)	3,64 (0,84)	4,56 (0,50)	5,01 (0,56)	6,41 (0,74)	6,27 (0,57)
<b>Acidez</b>	5,70 (0,60)	8,50 (0,38)	10,55 (0,64)	8,80 (0,00)	8,55 (0,89)	6,05 (0,10)	7,00 (0,33)	8,80 (0,33)	4,70 (0,20)
<b>pH</b>	6,12 (0,04)	5,43 (0,07)	5,03 (0,04)	4,87 (0,08)	4,87 (0,05)	5,09 (0,04)	5,52 (0,05)	5,29 (0,03)	5,45 (0,03)
<b>L</b>	89,44 (0,23)	88,80 (0,12)	85,50 (0,55)	69,73 (1,53)	65,68 (0,87)	62,86 (1,87)		60,18 (1,84)	62,28 (1,08)
<b>a</b>	-3,29 (0,15)	-2,18 (0,06)	-1,97 (0,02)	-1,63 (0,10)	-0,55 (0,21)	-0,24 (0,37)		-1,07 (0,66)	0,38 (0,48)
<b>b</b>	10,06 (0,12)	8,14 (0,31)	12,42 (0,66)	20,72 (0,37)	19,61 (1,53)	18,55 (1,78)		17,76 (1,67)	21,55 (0,51)
<b>L interior</b>	90,99 (0,22)	90,29 (0,12)	88,81 (0,48)	81,08 (0,43)	79,50 (1,39)	70,61 (2,78)		61,11 (1,28)	62,38 (0,35)
<b>a interior</b>	-3,27 (0,24)	-3,21 (0,08)	-3,25 (0,17)	-4,21 (0,14)	-4,09 (0,27)	-3,78 (0,33)		-3,23 (0,40)	-3,14 (0,41)
<b>b interior</b>	9,61 (0,09)	9,40 (0,21)	10,47 (0,67)	13,97 (0,59)	14,59 (0,72)	13,13 (1,58)		9,03 (0,74)	11,89 (0,46)

Tabela C. Resultados médios e desvios-padrão obtidos para o *Cynara* 3 ao longo do tempo de cura.

Parâmetros	Tempo de cura (dias)								
	1	3	7	14	21	35	49	60	90
<b>Dureza</b>	2,27 (0,28)	2,70 (0,08)	1,81 (0,13)	1,01 (0,17)	1,94 (0,17)	12,27 (1,57)	19,37 (4,47)	45,08 (3,97)	
<b>Adesividade</b>	0,27 (0,04)	0,36 (0,11)	0,43 (0,13)	0,97 (0,16)	2,29 (0,52)	8,60 (2,04)	11,72 (3,20)	19,90 (5,29)	
<b>G' <sub>1Hz</sub> (kPa)</b>	20,23 (1,51)	12,69 (1,53)	2,64 (0,60)	4,40 (2,06)	18,91 (7,83)	417,64 (64,65)	2106,39 (434,16)	2286,92 (525,44)	
<b>Gordura (g/100g)</b>	21,50 (0,71)	20,44 (0,52)	21,88 (0,60)	24,75 (0,35)	30,25 (0,96)	35,25 (0,96)	41,53 (0,47)	52,41 (1,45)	55,31 (1,13)
<b>GRS %</b>	53,56 (2,95)	50,53 (2,00)	49,09 (1,66)	49,33 (1,01)	52,26 (2,08)	50,78 (1,45)	55,24 (0,66)	64,82 (1,83)	63,92 (1,32)
<b>Humidade</b>	59,80 (1,64)	59,49 (2,43)	55,43 (0,56)	49,82 (1,21)	42,09 (1,90)	30,57 (1,32)	24,81 (1,33)	19,15 (0,39)	13,47 (0,56)
<b>HQIG</b>	76,19 (2,30)	74,76 (2,63)	70,96 (1,04)	66,20 (1,47)	60,34 (2,67)	47,21 (1,96)	42,43 (2,02)	40,27 (1,51)	30,15 (1,39)
<b>NT %</b>	3,48 (0,09)	3,58 (0,11)	3,71 (0,33)	4,35 (0,07)	4,39 (0,07)	4,45 (0,10)	4,32 (0,16)	5,12 (0,08)	5,84 (0,21)
<b>NSA %</b>	0,71 (0,01)	0,71 (0,02)	1,04 (0,01)	1,07 (0,01)	1,00 (0,04)	1,22 (0,11)	1,35 (0,04)	2,00 (0,06)	2,17 (0,10)
<b>NSA/NT %</b>	20,33 (0,66)	19,96 (0,49)	28,30 (2,50)	24,72 (0,56)	22,86 (1,03)	27,42 (2,87)	31,20 (0,35)	39,08 (1,46)	37,23 (2,04)
<b>NNP %</b>	0,05 (0,00)	0,05 (0,01)	0,04 (0,00)	0,06 (0,01)	0,06 (0,01)	0,09 (0,00)	0,11 (0,00)	0,17 (0,02)	0,21 (0,01)
<b>NNP/NT %</b>	1,40 (0,13)	1,45 (0,16)	1,14 (0,15)	1,47 (0,29)	1,47 (0,23)	2,03 (0,05)	2,66 (0,18)	3,41 (0,44)	3,68 (0,17)
<b>NA (mg Leu/g)</b>	0,01 (0,00)	0,05 (0,02)	0,06 (0,02)	0,09 (0,01)	0,15 (0,03)	0,18 (0,02)	0,25 (0,01)	0,27 (0,04)	0,34 (0,03)
<b>NA/NT %</b>	0,36 (0,10)	1,42 (0,58)	1,56 (0,43)	2,17 (0,15)	3,40 (0,72)	4,02 (0,45)	5,70 (0,18)	5,28 (0,73)	5,74 (0,50)
<b>Acidez</b>	6,10 (0,20)	8,00 (0,59)	10,40 (0,63)	9,30 (0,93)	7,70 (0,82)	6,05 (1,55)	5,05 (0,77)	3,90 (0,20)	4,40 (0,46)
<b>pH</b>	6,05 (0,05)	5,38 (0,07)	4,97 (0,01)	4,96 (0,05)	4,90 (0,14)	5,25 (0,12)	5,51 (0,10)	5,50 (0,02)	5,58 (0,03)
<b>L</b>	89,47 (0,18)	89,00 (0,07)	86,14 (0,26)	71,57 (0,79)	66,59 (0,77)	62,20 (2,26)		59,77 (0,36)	61,76 (0,42)
<b>a</b>	-3,29 (0,32)	-2,31 (0,06)	-1,94 (0,22)	-1,58 (0,82)	-0,78 (0,21)	-0,04 (0,85)		-0,42 (0,05)	1,04 (0,51)
<b>b</b>	9,78 (0,39)	8,12 (0,04)	11,42 (0,40)	18,97 (0,83)	20,89 (1,70)	18,92 (1,38)		18,21 (0,73)	22,07 (0,81)
<b>L interior</b>	90,99 (0,42)	90,53 (0,24)	88,80 (0,39)	80,86 (0,58)	79,18 (1,09)	69,63 (3,64)		58,80 (0,44)	63,15 (0,51)
<b>a interior</b>	-3,28 (0,39)	-3,03 (0,18)	-3,29 (0,12)	-3,86 (0,15)	-4,25 (0,41)	-3,79 (0,35)		-3,06 (0,30)	-3,44 (0,39)
<b>b interior</b>	9,45 (0,63)	9,00 (0,29)	10,42 (0,41)	13,07 (0,55)	14,73 (1,25)	12,49 (1,58)		8,82 (0,26)	15,00 (1,15)

Tabela D. Resultados médios e desvios-padrão obtidos para o coagulante animal ao longo do tempo de cura.

Parâmetros	Tempo de cura (dias)								
	1	3	7	14	21	35	49	60	90
<b>Dureza</b>	2,24 (0,22)	3,41 (0,22)	1,71 (0,15)	2,16 (0,19)	4,36 (0,41)	17,13 (3,26)	24,71 (5,58)	59,79 (4,17)	
<b>Adesividade</b>	0,27 (0,03)	0,34 (0,05)	0,57 (0,10)	2,52 (0,46)	6,21 (1,40)	13,42 (2,66)	14,94 (2,47)	19,74 (2,91)	
<b>G'1HZ (kPa)</b>	20,26 (1,40)	6,30 (1,75)	2,95 (0,46)	15,28 (3,75)	100,53 (38,67)	994,84 (317,68)	2924,25 (539,14)	2693,17 (936,61)	
<b>Gordura (g/100g)</b>	20,75 (0,87)	19,50 (1,22)	21,00 (1,35)	23,44 (0,43)	29,19 (1,77)	35,00 (0,82)	37,41 (1,54)	51,00 (1,33)	51,00 (0,31)
<b>GRS %</b>	54,84 (5,06)	50,99 (3,58)	50,52 (3,43)	50,74 (1,93)	55,60 (1,74)	53,62 (1,36)	53,16 (1,22)	64,89 (1,64)	60,20 (0,52)
<b>Humidade</b>	62,56 (1,39)	61,72 (1,42)	58,42 (0,21)	53,77 (1,39)	46,65 (1,27)	34,69 (2,18)	29,62 (3,14)	21,40 (0,38)	15,28 (0,57)
<b>HQIG</b>	78,26 (3,73)	76,69 (2,04)	73,97 (1,44)	70,23 (1,92)	67,05 (2,63)	53,36 (2,96)	47,26 (4,06)	43,70 (1,24)	31,18 (1,17)
<b>NT %</b>	3,25 (0,12)	3,42 (0,10)	3,71 (0,08)	4,17 (0,03)	4,31 (0,11)	4,42 (0,10)	4,29 (0,14)	5,36 (0,09)	5,95 (0,08)
<b>NSA %</b>	0,46 (0,01)	0,51 (0,01)	0,69 (0,05)	0,86 (0,34)	1,00 (0,03)	1,08 (0,06)	1,20 (0,02)	1,28 (0,01)	1,29 (0,04)
<b>NSA/NT %</b>	14,14 (0,89)	14,93 (0,15)	18,71 (1,71)	20,71 (7,96)	23,13 (0,83)	24,46 (1,20)	28,13 (1,29)	23,93 (0,50)	21,65 (0,43)
<b>NNP %</b>	0,05 (0,00)	0,03 (0,01)	0,05 (0,00)	0,07 (0,01)	0,07 (0,01)	0,10 (0,00)	0,12 (0,00)	0,16 (0,02)	0,20 (0,01)
<b>NNP/NT %</b>	1,63 (0,03)	0,95 (0,20)	1,42 (0,06)	1,73 (0,15)	1,73 (0,25)	2,20 (0,06)	2,75 (0,17)	3,02 (0,36)	3,39 (0,17)
<b>NA (mg Leu/g)</b>	0,01 (0,00)	0,05 (0,01)	0,03 (0,01)	0,08 (0,01)	0,13 (0,01)	0,16 (0,02)	0,15 (0,03)	0,31 (0,04)	0,33 (0,01)
<b>NA/NT %</b>	0,25 (0,10)	1,51 (0,13)	0,85 (0,24)	1,81 (0,17)	3,08 (0,29)	3,52 (0,54)	3,54 (0,66)	5,86 (0,80)	5,56 (0,26)
<b>Acidez</b>	7,40 (0,69)	6,70 (0,68)	9,95 (1,39)	9,55 (1,01)	9,05 (1,22)	8,50 (1,01)	6,40 (0,97)	5,80 (0,23)	4,50 (0,38)
<b>pH</b>	5,88 (0,08)	5,31 (0,03)	4,95 (0,04)	4,86 (0,03)	4,60 (0,06)	4,82 (0,15)	5,46 (0,14)	5,22 (0,08)	5,41 (0,02)
<b>L</b>	89,56 (0,12)	89,04 (0,17)	84,74 (0,26)	72,31 (1,41)	68,45 (0,76)	65,22 (3,05)		58,92 (0,67)	62,45 (1,06)
<b>a</b>	-3,32(0,12)	-2,31(0,04)	-1,93 (0,08)	-1,58 (0,32)	-0,86 (0,14)	-0,14 (0,79)		-1,04 (0,24)	-0,35 (0,40)
<b>b</b>	9,70 (0,19)	8,07 (0,11)	12,05 (0,27)	18,57 (0,69)	18,51 (0,32)	16,26 (2,53)		17,52 (0,21)	20,09 (0,74)
<b>L interior</b>	91,35 (0,26)	90,92 (0,46)	88,63 (0,28)	84,61 (0,39)	83,40 (1,50)	75,79 (2,28)		59,08 (0,75)	61,95 (1,11)
<b>a interior</b>	-3,33 (0,10)	-3,08 (0,13)	-3,47 (0,07)	-4,38 (0,13)	-4,91 (0,30)	-3,95 (0,69)		-2,88 (0,19)	-3,53 (0,16)
<b>b interior</b>	9,25 (0,36)	8,94 (0,33)	10,63 (0,41)	13,27 (0,36)	16,27 (0,94)	12,92 (1,07)		7,86 (0,33)	12,18 (0,44)